

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA  
POR POLIOMAVIRUS BK**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ana Bárcena Panero**

Bajo la dirección de los doctores

Juan Emilio Echevarría  
Cesare Giovanni Fedele

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Inmunología



**CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA  
POR POLIOMAVIRUS BK**

Memoria presentada por la licenciada

Dña. Ana Bárcena Panero

para optar al grado de Doctora en Ciencias

con Mención Europea

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de

Dr. Juan Emilio Echevarría

Dr. Cesare Giovanni Fedele

Esta tesis me ha salido española y, también, noruega. Por ello, tengo que agradecer a mucha gente a ambos lados de los Pirineos que este proyecto vea la luz.

En primer lugar, tengo que agradecer tu ayuda incondicional, Efrén. De ti me separé para continuar este proyecto y espero no tener que volverme a separar jamás. A mi familia, especialmente a mis padres, a mi hermana y a mi abuela Maru, que han sido y siempre serán la lucecita en la ventana que te guía para volver a casa.

A mis compañeros y amigos de la guarida-cuartito azul “mariapurísima”, a Paco Pozo, Mar y Ana Avellón, que se recorrieron Europa para compartir conmigo los días eternos y las *freske reken*, a Quique, que tanto me ha ayudado y hecho reír, a Sonia, Carolina, Marta, David, Juan Ledesma y Mayte. A todos vosotros, que me habéis echado una mano siempre que lo he necesitado. A Juan Echevarría y a Giovanni Fedele que me han dirigido y guiado en este proyecto y cuyas brillantes ideas han concebido esta tesis. A la gente que he conocido en la tercera planta (aunque algunos ya no estén): Carmen, que me adoptó como hija postiza, Ana Castellanos, Irene, Jose, Paco Salvador, Conchita, Paloma, Fernando de Ory, Pilar Balfagón, Teo, Lala, Jesús, Lourdes e Isabel por vuestra siempre agradable compañía y por los desayunos tan amenos que hemos compartido. A Laura y a Salva, con los que dí mis primeros pasos doctorales en sentido errático y que tan buenos momentos me han proporcionado. A Cristina, la parasitóloga-viróloga, a la que he conocido gracias a esta tesis y que es una tía estupenda.

I want to thank Ugo and Marikje that opened me the doors of their laboratories, although I am not an expert in barbecuing, and of their own house. Ugo, I have no words to express my gratitude to you. Also thanks to the people in their laboratories, especially to my friends Nancy and Izaskun. To Suvi, Violeta, Anaïs, and Nayouky, for the greatest moments of dance and friendship, you made me feel in Tromsø as in my place.

Finalmente, quiero agradecer esta tesis a mis amigas de toda la vida, Esther, Águeda, Toñi, Cuca, Yoli, Marisa, Olatz y Ruthiña, que siempre me han apoyado y que me han acompañado en este largo camino haciéndolo mucho más llevadero y divertido.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>1.-ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2.-INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
2.1.-LOS POLIOMAVIRUS .....	2
2.2.-CLASIFICACIÓN DE LOS POLIOMAVIRUS .....	2
2.3.-CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS POLIOMAVIRUS.....	6
2.3.1.-MORFOLOGÍA DEL VIRIÓN .....	6
2.3.2.-ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA .....	7
2.3.2.1.-LA REGIÓN TEMPRANA .....	8
2.3.2.2.-LA REGIÓN TARDÍA.....	10
2.3.2.3.-LA REGIÓN REGULADORA .....	11
2.4.-LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS .....	12
2.4.1.-DESCUBRIMIENTO DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS .....	12
2.4.2.-EPIDEMIOLOGÍA DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS .....	13
2.4.3.- PATOLOGÍAS EN HUMANOS ASOCIADAS A LOS VIRUS BK Y JC Y A OTROS POLIOMAVIRUS.....	15
2.4.3.1.-NEFROPATÍA INTERSTICIAL .....	17
2.4.3.2.-CISTITIS HEMORRÁGICA .....	21
2.4.3.3.- LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA .....	22
2.4.3.4.- INFECCIÓN NEUROLÓGICA DEBIDA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK ...	26
2.5.- DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS BK Y JC...29	
2.5.1.-TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO BASADAS EN DETECCIÓN GENÓMICA. PCR CONVENCIONAL Y PCR A TIEMPO REAL .....	29
2.5.2.-DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA NEFROPATÍA INTERSTICIAL .....	32
2.5.2.1.-ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	32
2.5.2.2.- CÉLULAS SEÑUELO. HAUFEN.....	33
2.5.2.3.-PCR CONVENCIONAL Y CUANTITATIVA EN ORINA Y SANGRE .....	33
2.5.2.4.-PANEL INTERNACIONAL PARA EL DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DE LOS PACIENTES.....	34
2.5.3.-DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA CISTITIS HEMORRÁGICA .....	35

2.5.4.- DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA .....	36
2.5.4.1.-ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	36
2.5.4.2.- PRUEBAS DE NEUROIMAGEN .....	36
2.5.4.3-PCR EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO .....	37
2.5.5.-DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA ASOCIADA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK .....	37
2.6.-TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS BK Y JC .....	38
2.6.1.-TRATAMIENTO DE LA NEFROPATÍA INTERSTICIAL .....	38
2.6.2.-TRATAMIENTO DE LA CISTITIS HEMORRÁGICA .....	38
2.6.3.-TRATAMIENTO DE LA LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA.	39
2.6.4.-TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA ASOCIADA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK .....	39
2.7.- POLIOMAVIRUS HUMANO BK .....	39
2.7.1.- ESTRUCTURA DEL GENOMA .....	40
2.7.1.1.-LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE LA CÁPSIDA VP1, SUBTIPOS.....	40
2.7.1.2.-LA REGIÓN REGULADORA Y SUS REORGANIZACIONES .....	43
2.8.-CICLO REPLICATIVO DEL POLIOMAVIRUS HUMANO BK .....	48
2.8.1.-UNIÓN A LOS RECEPTORES CELULARES .....	48
2.8.2.-ENTRADA CELULAR, TRÁFICO INTRACELULAR Y LIBERACIÓN DEL GENOMA.....	48
2.8.3.-TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN .....	49
2.8.4.-ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES .....	50
2.9.-PATOGENIA DEL POLIOMAVIRUS HUMANO BK.....	51
2.9.1.- TRANSMISIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA.....	51
2.9.2.- DISEMINACIÓN Y PERSISTENCIA .....	52
2.9.3. –REACTIVACIÓN Y EXCRECIÓN URINARIA .....	53
2.10.-RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR FRENTE AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK.....	55
2.10.1.-INMUNIDAD INTRÍNSECA .....	55
2.10.2.-INMUNIDAD INNATA.....	55
2.10.3.-INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	56
<b>3.-OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>

#### **4.-SCIENTIFIC ARTICLE: “DEVELOPMENT AND VALIDATION WITH CLINICAL SAMPLES OF INTERNALLY CONTROLLED MULTIPLEX REAL-**

<b>TIME PCR FOR DIAGNOSIS OF BKV AND JCV IN ASSOCIATED PATHOLOGIES”</b> .....	<b>59</b>
4.1.-OBJETIVOS .....	59
4.2.-CONCLUSIONES .....	59
<b>5.- SCIENTIFIC ARTICLE: “BK POLYOMAVIRUS WITH ARCHETYPAL AND REARRANGED NON-CODING CONTROL REGIONS ARE PRESENT IN CEREBROSPINAL FLUIDS FROM PATIENTS WITH NEUROLOGICAL COMPLICATIONS”</b> .....	<b>61</b>
5.1.-OBJETIVOS .....	61
5.2.-CONCLUSIONES .....	61
<b>6.-SCIENTIFIC ARTICLE: “BK VIRUS-ASSOCIATED INFECTION IN CEREBROSPINAL FLUID OF NEUROLOGICAL PATIENTS AND MUTATION ANALYSIS OF THE COMPLETE VP1 GENE IN DIFFERENT PATIENT GROUPS”</b> .....	<b>72</b>
6.1.-OBJETIVOS .....	72
6.2.-CONCLUSIONES .....	72
<b>7.-DISCUSIÓN</b> .....	<b>74</b>
<b>8.-CONCLUSIONS</b> .....	<b>98</b>
<b>9.-REFERENCIAS</b> .....	<b>99</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.-</b> a) Micrografía electrónica de viriones de poliomavirus, b) Esquema de la arquitectura del virión de poliomavirus.....	6
<b>Figura 2.2.-</b> Representación esquemática del genoma de los poliomavirus. ....	7
<b>Figura 2.3.-</b> Dominios funcionales del antígeno T de los poliomavirus. ....	8
<b>Figura 2.4.-</b> Patogenia de la NAPV asociada a la infección por el BKPyV. ....	20
<b>Figura 2.5.-</b> a) Diagrama del tropismo del JCPyV al producir LMP; b) Hipótesis del arquetipo para explicar la patogenia de la LMP.....	25
<b>Figura 2.6.-</b> Mecanismo de las sondas de hidrólisis o TaqMan. ....	31
<b>Figura 2.7.-</b> Ejemplo de curva patrón generada a partir de cinco diluciones de patrones conocidos.....	32
<b>Figura 2.8.-</b> Cribado y monitorización de la replicación del poliomavirus BK.....	35
<b>Figura 2.9.-</b> Representación esquemática de la región reguladora arquetípica del poliomavirus BK...44	
<b>Figura 2.10.-</b> Ruta de entrada del BKPyV en la célula infectada. ....	49
<b>Figura 2.11.-</b> Patogenia de la primoinfección y de la reactivación del poliomavirus BK.....	51
<b>Figura 7.1.-</b> Carga del BKPyV en el LCR de los pacientes neurológicos. ....	96

ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 2.1.-** Especies de poliomavirus, abreviaturas, hospedadores, número de acceso en GenBank y referencias del artículo donde fueron descritos. .... 4

**Tabla 2.2.-** Regiones codificantes de los distintos poliomavirus humanos. .... 9

**Tabla 2.3.-** Patrones de las principales patologías asociadas a la replicación de poliomavirus humanos o a su respuesta inmune. ....28

**TABLE 5.S1.** Previous reported BKPyV strains with similar NCCR anatomy to those described in this study. ....63

**TABLE 5.S2.** Putative transcription factor binding sites in the transcriptional control region of NCCR WW (PQRS) .....64

**TABLE 5.S3.** Removal or creation of putative transcription factor binding sites due to rearrangements of the P, Q, R, and S blocks. ....68

**Tabla 7.1.-** Detección de la región reguladora y de la proteína VP1 del BKPyV, de la presencia de herpesvirus y enterovirus y cuantificación de la carga del BKPyV y el JCPyV en las muestras de pacientes neurológicos .....76



# ABREVIATURAS

Para evitar confusiones, las abreviaturas empleadas en el presente trabajo para denominar a los poliomavirus y herpesvirus son las recomendadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>).

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APyV	Poliomavirus aviar
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BatPyV	Poliomavirus de murciélago
BKPyV	Poliomavirus BK
BPyV	Poliomavirus bovino
BPyV2	Poliomavirus del babuino 2
CaPyV	Poliomavirus del canario
CH	Cistitis hemorrágica
ChPyV	Poliomavirus del chimpancé
CMV	Citomegalovirus
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CPyV	Poliomavirus del cuervo
CyPV	Poliomavirus del mono cangrejero
Egr-1	Proteína del factor de crecimiento
FPyV	Poliomavirus del pinzón
GHPyV	Poliomavirus hemorrágico del ganso
HaPyV	Poliomavirus del hámster
HHV	Virus herpes simple
HHV-4	Virus Epstein-Barr
HHV-5	Citomegalovirus
HHV-6	Virus herpes 6
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HPyV6	Poliomavirus humano 6
HPyV7	Poliomavirus humano 7
HPyV9	Poliomavirus humano 9
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
JCPyV	Poliomavirus JC
KIPyV	Poliomavirus KI
LCR	Líquido cefalorraquídeo

LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
LPyV	Poliomavirus B-linfotrófico
MCPyV	Poliomavirus de las células de Merkel
MLA	Marco de lectura abierto
MPtV	Virus pneumotrópico de ratón
MPyV	Poliomavirus de ratón
NAPV	Nefropatía asociada a poliomavirus humanos
OraPyV1	Poliomavirus del orangután de Borneo
OraPyV2	Poliomavirus del orangután de Sumatra
ORI	Origen de replicación
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLT	Proteína líder temprana
PP2A	Fosfatasa 2A
pRb	Proteína del retinoblastoma
PSV	Partículas semejantes a virus
RatPyV	Poliomavirus de la rata atómica
RE	Retículo endoplásmico
RKV	Virus vacuolante del riñón de conejo
SA12	Poliomavirus de babuino 1
SI	Sistema Inmune
SLN	Señal de localización nuclear
SLPyV	Poliomavirus del león marino de California
SNC	Sistema nervioso central
SqPyV	Poliomavirus del mono ardilla
SRI	Síndrome de reconstitución inmune
SV40	Virus del simio 40
TAAA	Terapia antirretroviral altamente activa
TMO	Trasplante de médula ósea
TSPyV	Poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WUPyV	Poliomavirus WU

# 1.-ABSTRACT

Human polyomavirus BK (BKPv) is the aetiological agent of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) and of hemorrhagic cystitis (HC) while human polyomavirus JC (JCPv) is associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). However, JCPv can give rise to PVAN and HC and BKPv has been detected in cerebrospinal fluid samples (CSF) from patients with Central Nervous System (CNS) disease, including PML. During the period 1998–2011, 2,406 CSF samples from patients with suspected JCPv infection were tested for the presence of BKPv, JCPv, and SV40 large T antigen DNA by a multiplex PCR assay in the National Centre of Microbiology. Twenty neurological patients with at least one BKPv DNA-positive CSF specimen were identified.

Firstly, an internally-controlled multiplex real-time PCR was developed and showed to be suitable for the diagnosis of polyomavirus BK and JC infection, providing a sensitive, reproducible and specific quantification of the viral load of both viruses in samples of patients with associated pathologies. The present method was used to quantify BKPv in the CSF of neurological patients for the first time, showing a median of  $9 \times 10^3$  copies/ml (range  $6 \times 10^2$ – $2 \times 10^6$  copies/ml) and no differences were observed with JCPv viral load in PML patients.

Secondly, BKPv non coding control region (NCCR) sequences from the 20 neurological patients were determined and compared to NCCR sequences from BKPv variants present in renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients and healthy pregnant women. The archetypal conformation of BK polyomavirus regulatory region was predominant in the neurological patients and in other groups of patients and controls and, therefore, rearrangements are not sufficient *per se* to induce neurotropism. Five out of six early and four out of six late rearranged promoters from BK polyomavirus neurological strains showed significantly higher activity than the corresponding archetypal promoter in transfection studies with Vero cells.

Thirdly, the entire VP1 protein sequence of 14 of the 20 neurological BKPv isolates was determined and compared to VP1 sequences from strains circulating in patients with other pathological conditions such as renal transplant recipients and bone marrow transplant recipients and from healthy pregnant women. Our results revealed that VP1 reference sequence was the most common in the CSF of the neurological patients and that subtype I was predominant in all patients groups. This suggests that VP1 polymorphism is not strictly necessary or sufficient for BKPv-associated pathology and that specific strains are not related to a specific clinical manifestation. However, a significant accumulation of amino acid substitutions in the BC loop of VP1, while a decreased tendency for EF loop mutations was found. Molecular modelling calculations indicated that the VP1 mutants may have altered host cell receptor binding properties.

## 2.-INTRODUCCIÓN

### 2.1.-LOS POLIOMAVIRUS

La historia de los poliomavirus comienza en el año 1953 cuando Ludwig Gross de forma accidental aísla el primer poliomavirus como un agente contaminante de cultivos del virus de la leucemia de ratón [Gross, 1953a]. Una vez inoculado en ratones, observó que el retrovirus aislado no sólo provocaba la aparición de leucemia sino de adenocarcinomas en las glándulas parótidas [Gross, 1953b]. Además la inoculación, en ratones recién nacidos, de extractos de los tumores de las glándulas parótidas inducía en los mismos la aparición de muchos tipos de tumores diferentes [Gross, 1954]. Dicho agente fue identificado como un virus y denominado poliomavirus de ratón refiriéndose a su capacidad de producir múltiples tumores en ratones (en griego poli- significa mucho y -oma se refiere a cáncer) [Stoner, 2001].

La poliomavirus, o virus pertenecientes a la familia *Polyomaviridae*, se caracterizan por ser virus pequeños, sin envuelta y de cápside icosaédrica cuyo genoma es una única molécula de ADN bicatenario [Imperiale, 2007]. Los poliomavirus infectan a una gran variedad de vertebrados y más específicamente, a aves y mamíferos, incluido el hombre [Johne et al., 2011; zur Hausen, 2008].

En la actualidad, se conocen nueve poliomavirus humanos: BK (BKPyV), JC (JCPyV), KI (KIPyV), WU (WUPyV), el poliomavirus de las células de Merkel (MCPyV), el poliomavirus humano 6 (HPyV6), el poliomavirus humano 7 (HPyV7), el poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa (TSPyV) y el poliomavirus humano 9 (HPyV9). De los poliomavirus que infectan a humanos los más conocidos son el BKPyV y el JCPyV, ambos descritos en 1971 [Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971]. El descubrimiento de los restantes poliomavirus humanos se ha producido a partir del año 2007 hasta la actualidad [Allander et al., 2007; Feng et al., 2008; Gaynor et al., 2007; Scuda et al., 2011; Schowalter et al., 2010; van der Meijden et al., 2010]. Hasta el momento, sólo el BKPyV, el JCPyV, el MCPyV y el TSPyV han demostrado estar asociados a patología en humanos [Feng et al., 2008; Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971; van der Meijden et al., 2010].

### 2.2.-CLASIFICACIÓN DE LOS POLIOMAVIRUS

Según el reciente informe del grupo de estudio de la familia *Polyomaviridae* del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los virus pertenecientes a la familia *Polyomaviridae* se subdividen en dos géneros de virus de mamíferos, *Orthopolyomavirus* y *Wukipolyomavirus* y un género de virus de aves, *Avipoliomavirus*. Los criterios en los que se fundamenta esta clasificación

son: (i) el rango de hospedadores, (ii) el repertorio genético y (iii) la identidad de la secuencia de ADN de los genomas completos (81-84% para las especies y para los géneros a la espera de un mejor criterio) [Johne et al., 2011].

Las principales diferencias entre poliomavirus de mamíferos y de aves que han permitido la consistente diferenciación de ambos grupos se enumeran a continuación:

a) Rango de hospedadores

Mientras que los poliomavirus de mamíferos muestran una gran especificidad de hospedadores y de tejidos *in vivo* e *in vitro*, los poliomavirus de aves manifiestan un amplio rango de hospedadores y son capaces de replicar en una gran variedad de tejidos [Johne et al., 2011; White et al., 2009]. Los poliomavirus aviar (APyV) y hemorrágico del ganso (GHPyV), por ejemplo, infectan a distintas especies de aves [Johne and Muller, 2007; Pingret et al., 2008]

b) Capacidad oncogénica *in vivo* y de transformación *in vitro*

Los poliomavirus de mamíferos tienen capacidad de transformar células *in vitro* y de producir tumores *in vivo* gracias a la expresión de sus proteínas tempranas las cuáles interaccionan con proteínas celulares del hospedador como p53 o la proteína del retinoblastoma (pRb)[Moens and Johannessen, 2008]. El MCPyV es el primer poliomavirus que ha podido ser asociado de forma consistente con la aparición de un proceso oncogénico como el carcinoma de Merkel [Feng et al., 2008; Kassem et al., 2008]. Esta capacidad tumorogénica tanto *in vivo* como de transformación *in vitro* en cultivos celulares parece estar ausente de los poliomavirus de aves [zur Hausen, 2008].

c) Sintomatología de la primoinfección.

En general, la infección primaria de los poliomavirus de mamíferos no está asociada a síntomas clínicos o son leves [Goudsmit et al., 1981; Goudsmit et al., 1982]. Por supuesto, existen excepciones y el poliomavirus pneumotrópico de ratón produce una patología grave y aguda en ratones recién nacidos. Además, en el caso del BKPyV y el JCPyV, las consecuencias de esta primoinfección en pacientes inmunodeprimidos, como los trasplantados o los pacientes VIH-positivos, son mucho más graves. Por el contrario, los poliomavirus de aves, o al menos los dos que se han estudiado más detalle, el APyV y el GHPyV, dan lugar a enfermedades inflamatorias agudas y crónicas sobre todo en aves jóvenes [Johne and Muller, 2007]. El APyV produce la enfermedad del polluelo de periquito y el GHPyV da lugar a cistitis hemorrágica y enteritis en crías de ganso [Guerin et al., 2000; Muller and Nitschke, 1986].

d) Estructura genómica.

Los poliomavirus de mamíferos y aves difieren, asimismo, en su estructura genómica. Por ejemplo, en varios poliomavirus de aves, entre ellos el APyV, se genera la proteína VP4 que no existe en los poliomavirus de mamíferos, a partir de la región tardía de su genoma mediante “corte y empalme” alternativo (*splicing* alternativo) [Johne and Muller, 2003; John et al., 2006]. Por otra parte, el dominio de unión a ADN del antígeno T en los poliomavirus de mamíferos difiere en la secuencia consenso, GAGGC, con la secuencia equivalente en los poliomavirus de aves, CC(A/T6)GG [Johne et al., 2006].

La división de los poliomavirus de mamíferos en los géneros *Wukipolyomavirus*, que contiene a los poliomavirus humanos KIPyV, WUPyV, HPyV6 y HPyV7, y *Orthopolyomavirus*, que incluye al resto de poliomavirus de mamíferos, se sustenta en la divergencia en la secuencia de nucleótidos existente entre los dos grupos. Dicha divergencia se puede observar en los árboles filogenéticos llevados a cabo con genomas completos pero es aún más patente si sólo se incluyen en el análisis, los genes tardíos [Johne et al., 2011].

En base a estos criterios, la clasificación de las especies de poliomavirus es la que se muestra a continuación:

**Tabla 2.1.-** Especies de poliomavirus, abreviaturas, hospedadores, número de acceso en GenBank y referencias del artículo donde fueron descritos.

Clasificación*	Abreviatura	Hospedador	GenBank	Referencia
<b>Género <i>Orthopolyomavirus</i></b> (especies del tipo <i>SV40</i> )				
<i>Poliomavirus de babuino 1</i>	SA12	Mono	NC_007611	[Malherbe and Harwin, 1963]
<i>Poliomavirus de murciélago</i>	BatPyV	Murciélago	NC_011310	[Misra et al., 2009]
<i>Poliomavirus B-linfotrófico</i>	LPyV	Mono	NC_004763	[zur Hausen and Gissmann, 1979]
<i>Poliomavirus BK</i>	BKPyV	Humano	NC_001538	[Gardner et al., 1971]
<i>Poliomavirus del orangután de Borneo</i>	OraPyV1	Orangután	NC_013439	[Groenewoud et al., 2010]
<i>Poliomavirus bovino</i>	BPyV	Ganado vacuno	NC_001442	[Rangan et al., 1974]
<i>Poliomavirus del león marino de California</i>	SLPyV	León marino	NC_013796	[Colegrove et al., 2010]

Clasificación*	Abreviatura	Hospedador	GenBank	Referencia
<i>Poliomavirus del hámster</i>	HaPyV	Hámster	NC_001663, AJ006015	[Graffi et al., 1967]
<i>Poliomavirus JC</i>	JCPyV	Humano	NC_001699	[Padgett et al., 1971]
<i>Poliomavirus de las células de Merkel</i>	MCPyV	Humano	NC_010277	[Feng et al., 2008]
<i>Virus pneumotrópico de ratón</i>	MPtV	Ratón	NC_001505.2	[Kilham and Murphy, 1953]
<i>Poliomavirus de ratón</i>	MPyV	Ratón	NC_001515	[Gross, 1953a]
<i>Virus del simio 40</i>	SV40	Mono	NC_001669	[Sweet and Hilleman, 1960]
<i>Poliomavirus del mono ardilla</i>	SqPyV	Mono	NC_009951	[Verschoor et al., 2008]
<i>Poliomavirus del orangután de Sumatra</i>	OraPyV2	Orangután	FN356901	[Groenewoud et al., 2010]
<i>Poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa</i>	TSPyV	Humano	NC_014361	[van der Meijden et al., 2010]
<b>Otro virus que podría pertenecer al género <i>Orthopoliomavirus</i></b>				
<i>Poliomavirus del chimpancé</i>	ChPyV	Chimpancé	AY691168	[Johne et al., 2005]
<b>Género <i>Wukipolyomavirus</i> (especies del tipo del <i>Poliomavirus KI</i>)</b>				
<i>Poliomavirus humano 6</i>	HPyV6	Humano	NC_014406	[Schowalter et al., 2010]
<i>Poliomavirus humano 7</i>	HPyV7	Humano	NC_014407	[Schowalter et al., 2010]
<i>Poliomavirus KI</i>	KIPyV	Humano	NC_009238	[Allander et al., 2007]
<i>Poliomavirus WU</i>	WUPyV	Humano	NC_009539	[Gaynor et al., 2007]
<b>Género <i>Avipolyomavirus</i> (especies del tipo del <i>Poliomavirus aviar</i>)</b>				
<i>Poliomavirus aviar</i>	APyV	Loro y otras aves	NC_004764.2	[Bernier et al., 1981; Bozeman et al., 1981]
<i>Poliomavirus del canario</i>	CaPyV	Canario	GU345044	[Halami et al., 2010]
<i>Poliomavirus del cuervo</i>	CPyV	Grajilla	NC_007922	[Johne et al., 2006]
<i>Poliomavirus del pinzón</i>	FPyV	Camachuelo	NC_007923	[Johne et al., 2006]
<i>Poliomavirus hemorrágico del ganso</i>	GHPyV	Ganso	NC_004800	[Guerin et al., 2000]
<b>Otros virus con similitudes a los poliomavirus a los que no se les ha asignado especie#</b>				
Poliomavirus de la rata atómica	RatPyV	Rata	-	[Ward et al., 1984]
Poliomavirus del babuino 2	BPyV2	Mono	-	[Gardner et al., 1989]

Clasificación*	Abreviatura	Hospedador	GenBank	Referencia
Poliomavirus del mono cangrejero	CyPV	Mono	-	[Wognum et al., 1984]
Virus vacuolante del riñón de conejo	RKV	Conejo	-	[Ito et al., 1966]

Adaptado y completado a partir de Johne et al., 2011.

\* El poliomavirus humano 9 (HPyV9) fue descrito después de que el ICTV llevara a cabo la presente revisión en la clasificación de la familia *Polyomaviridae* [Scuda et al., 2011]. Su número de acceso en GenBank es el HQ696595.

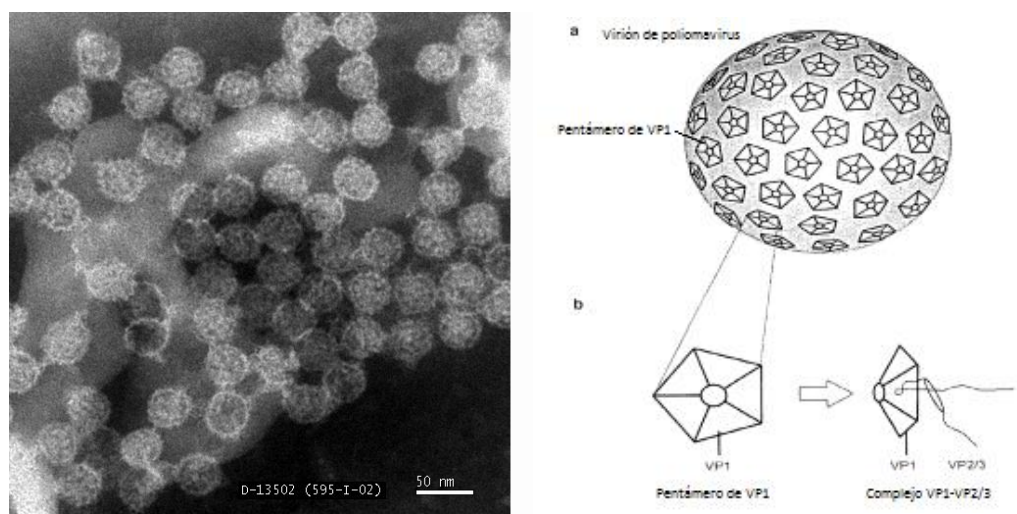
# Debido a que la secuencia del genoma completo de estos virus no está disponible no ha sido posible asignarles especie.

2.3.-CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS  
POLIOMAVIRUS

2.3.1.-MORFOLOGÍA DEL VIRIÓN

Los viriones de los poliomavirus son partículas desnudas de aproximadamente 40-45 nm de diámetro (**Figura 2.1. a**). Están compuestos por las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, un genoma circular de doble cadena y las histonas celulares H2A, H2B, H3 y H4 [Imperiale, 2007].

La cápsida posee simetría icosaédrica (T=7) y está formada por 72 pentámeros cada uno de los cuales contiene cinco moléculas de VP1 y una de VP2 o de VP3. Sólo las moléculas de VP1 están expuestas en la superficie de la cápsida [Liddington et al., 1991; Stehle et al., 1994] (**Figura 2.1. b**). Los poliomavirus, a pesar de ser partículas desnudas, son muy resistentes a la inactivación por calor y por formalina y a los solventes lipídicos [Imperiale, 2007].

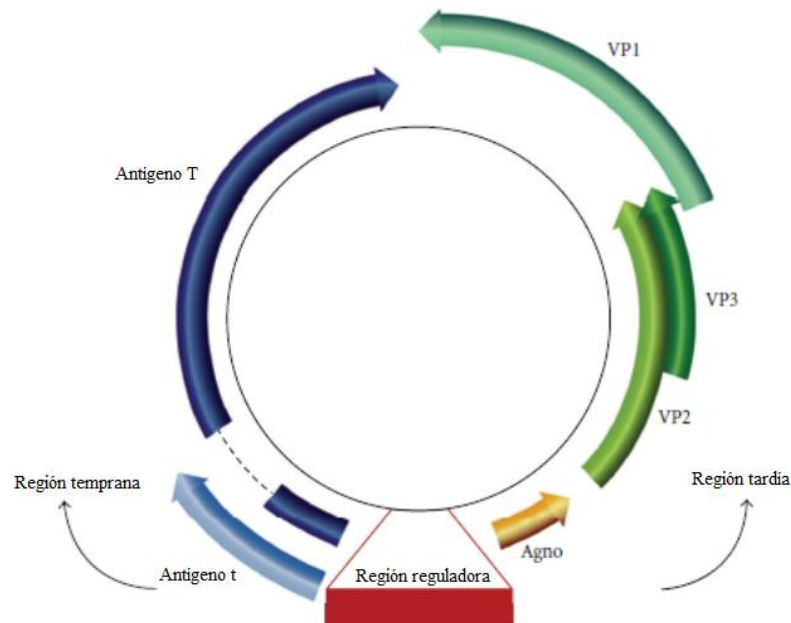


**Figura 2.1.- a)** Micrografía electrónica de viriones de poliomavirus, **b)** Esquema de la arquitectura del virión de poliomavirus.  
Amablemente cedida por el Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto de Salud Carlos III y tomado de Tsai and Qian, 2010, respectivamente.



### 2.3.2.-ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma de los poliomavirus es una molécula de ADN de aproximadamente 5 pares de kilobases de doble cadena y circular y codifica entre 5 y 9 proteínas. Se divide en tres partes: (i) la región temprana, que codifica las proteínas funcionales antígeno T y antígeno t, (ii) la región tardía, que codifica las tres proteínas de la cápsida VP1-3 y (iii) la región reguladora que contiene el origen de replicación bidireccional (ORI) y los promotores de la transcripción de las regiones temprana y tardía (**Figura 2.2.**) [Imperiale, 2007; White et al., 2009].



**Figura 2.2.**-Representación esquemática del genoma de los poliomavirus.

Adaptado de Moens et al., 2011.

En la infección lítica, la transcripción de las regiones temprana y tardía se encuentra regulada temporalmente [Imperiale, 2007]. Antes de la iniciación de la síntesis de ADN, se transcribe la región temprana del genoma de los poliomavirus. La expresión de los antígenos T y t provoca que el ciclo celular entre en fase S permitiendo que el ADN replique. Asimismo, el antígeno T se une al ORI y coopera con la ADN polimerasa y otros factores celulares de replicación para iniciar la síntesis del ADN. La transcripción de la región tardía no tiene lugar hasta después del comienzo de la síntesis del ADN [White et al., 2009].

En aquellas células no permisivas a la infección, sólo se transcriben las proteínas codificadas en la región temprana (antígenos T y t) cuya expresión puede provocar la transformación de las mismas [White et al., 2009].

### 2.3.2.1.-LA REGIÓN TEMPRANA

La región temprana codifica las proteínas tempranas, las cuáles se expresan antes del comienzo de la replicación del ADN. La transcripción del genoma de los poliomavirus en uno de los dos sentidos posibles a partir del ORI da lugar a los ARN mensajeros tempranos. Los intrones de los mismos son eliminados por la maquinaria celular al sufrir diferentes alterativas de “corte y empalme”, generando al menos dos ARN mensajeros tempranos que se traducen en los antígenos T y t [Imperiale, 2007].

#### 2.3.2.1.1.- El antígeno T

El antígeno T es imprescindible para la replicación bidireccional del genoma de los poliomavirus, la cual se desencadena a partir de la unión del antígeno T a secuencias específicas del ORI [White et al., 2009]. El antígeno T también lleva a cabo una función 3'-5' helicasa dependiente de ATP en dicho proceso de replicación viral [Goetz et al., 1988]. Asimismo, modula los promotores virales y es responsable del inicio de la transcripción de los genes tardíos. El antígeno T de algunos poliomavirus puede, asimismo, transformar células de diferentes especies e inducir tumores en modelos animales mediante diversos mecanismos entre los cuáles se incluyen las interacciones con Hsc70, pRb o p53 [Moens et al., 2011].

Con el fin de llevar a cabo las mencionadas funciones, el antígeno T contiene un dominio helicasa y varios dominios funcionales de unión a ADN y a diversas proteínas celulares (**Figura 2.3.**). Entre las proteínas que se unen al antígeno T, se encuentran algunas implicadas en la replicación, como la proteína A [Collins and Kelly, 1991; Melendy and Stillman, 1993] o el complejo ADN polimerasa  $\alpha$ -primasa [Dornreiter et al., 1992]; proteínas tumorales como pRb y p53 [Kierstead and Tevethia, 1993; Schmieg and Simmons, 1988] o chaperonas celulares como Hsc70 que se une al antígeno T mediante el denominado dominio DnaJ [Campbell et al., 1997; Sawai et al., 1994].



**Figura 2.3.-** Dominios funcionales del antígeno T de los poliomavirus.

LXCXE se une a proteínas de la familia del retinoblastoma como pRb, p107 y p130; ORI: origen de replicación; SLN: señal de localización nuclear; Zn: dedo de Zinc. Adaptado de Moens et al., 2011.

El antígeno T difiere mucho entre los diferentes poliomavirus humanos, siendo extremo en el caso del MCPyV, lo cual puede deberse a las propiedades oncogénicas exclusivas del mismo, como se explicará más adelante [Johnson, 2010].

### 2.3.2.1.2.- El Antígeno t

El antígeno t, por su parte, lleva a cabo un papel auxiliar de cooperación con el antígeno T. Contiene varios dominios funcionales entre los que destaca aquel que interacciona con la fosfatasa celular 2A (PP2A) inactivándola, proceso implicado en la transformación celular [Sablina and Hahn, 2008; Yang et al., 1991].

### 2.3.2.1.3.- Otras proteínas tempranas

Debido a diversas alternativas de “corte y empalme”, se generan entre dos y cinco proteínas dependiendo del poliomavirus del que se trate. En los poliomavirus del ratón y del hámster, por ejemplo se genera un tercer ARN mensajero que da lugar al antígeno t medio. En el JCPyV, se producen una serie de ARN mensajeros a partir de los que se traducen las proteínas denominadas T’135, T’136 y T’165 [Trowbridge and Frisque, 1995] las cuáles pueden unirse a proteínas de la familia del retinoblastoma e inducir la transformación de células [Moens et al., 2007]. El BKPyV genera un ARN mensajero que se traduce en un Antígeno T truncado [Abend et al., 2009b]. Finalmente, en el SV40 existe un marco de lectura abierto que codifica una proteína denominada 17kT o antígeno t diminuto [Riley et al., 1997]. Se ha visto que los poliomavirus humanos BKPyV, JCPyV, MCPyV codifican proteínas similares (**Tabla 2.2.**).

**Tabla 2.2.-** Regiones codificantes de los distintos poliomavirus humanos.

Poliomavirus humanos	Genoma (pb) <sup>@</sup>	Antígeno T (aa) <sup>&amp;</sup>	Antígeno T (aa)	Agno proteína (aa)	VP1 (aa)	VP2 (aa)	VP3 (aa)	VP4 (aa)	MLA <sup>s</sup> abierto	micro ARN
SV40	5243	708	174	62	364	352	234	125	17Kt, SPLT <sup>#</sup>	Sí
BKPyV	5141	695	172	66	362	351	232	MLA posible	BPLT	Sí
JCPyV	5130	688	172	71	354	344	225	MLA posible	JPLT, T’135, T’136, T’165	Sí
LPyV	5270	697	189	Ausente	368	356	237	Ausente	?	?
KIPyV	5040	641	191	Ausente	378	400	257	Ausente	?	?
WUPyV	5229	648	194	Ausente	369	415	272	Ausente	?	?

MCPyV	5387	818	186	Ausente	423	241	196	Ausente	57 kT	Sí
HPyV6	4926	669	190	Ausente	387	336	215	Ausente	?	?
HPyV7	4949	671	193	Ausente	380	329	209	Ausente	?	?
TSPyV	5232	698/692*	199	Ausente	376	313	195	Ausente	?	?
HPyV9	5026	690	189	Ausente	371	352	233	Ausente	?	?

---

Adaptado de Moens et al., 2011.

@ pb: pares de bases; & aa: aminoácidos; \$ MLA: marco de lectura abierto; # PLT: proteína líder temprana ; \* dos posibles variantes por las diferentes alternativas de “corte y empalme”.

### 2.3.2.2.-LA REGIÓN TARDÍA

La transcripción de la región tardía genera las proteínas tardías estructurales, las cuáles se expresan después del comienzo de la replicación. Tiene lugar a partir del ORI en el sentido opuesto a los tempranos y a partir de la hebra de ADN complementaria. La traducción de los genes tardíos también está sometida a un proceso de “corte y empalme” alternativo. En este caso, a partir de uno de los ARN mensajeros se genera la proteína VP1 y a partir del otro, las proteínas VP2 y VP3. Los marcos de lectura abiertos de las proteínas VP2 y VP3 solapan de forma que VP2 contiene a la proteína VP3 en su totalidad en el extremo C-terminal, mientras que el extremo N-terminal es único [Imperiale, 2007].

#### 2.3.2.2.1.-Las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3

La proteína VP1 o proteína mayor de la cápsida constituye aproximadamente el 70% de las proteínas totales de los poliomavirus. Está implicada en la entrada de todos los poliomavirus en las células a través de su unión a los receptores celulares [Neu et al., 2009; Sapp and Day, 2009]. La predicción de las estructuras de la proteína VP1 de todos los poliomavirus humanos muestra la existencia en todos ellos de bucles externos a través de los cuales tendría lugar la interacción con los receptores celulares [Van Ghelue et al., 2012].

Las proteínas VP2 y VP3 pueden ser necesarias para la correcta encapsidación del genoma de los poliomavirus tras la replicación. Asimismo, la proteína VP2 es miristilada, al menos en los poliomavirus del ratón y en el SV40, y podría tener un papel en la entrada celular [Krauzewicz et al., 1990].

#### **2.3.2.2.2.-La agnoproteína**

En la mayoría de los poliomavirus, la proteína no estructural denominada agnoproteína se traduce a partir del exón líder de los ARN mensajeros tardíos. Sin embargo, los genomas de los poliomavirus humanos nuevos, KIPyV, WUPyV, HPyV6, HPyV7, MCPyV, TSPyV y HPyV9 y el genoma del LPyV no contienen un marco de lectura abierto para dicha proteína [Van Ghelue et al., 2012].

Aunque no se conoce su función exacta, se sabe que es fundamental para la eficiente propagación del virus en cultivo celular [Johannessen et al., 2008; Sariyer et al., 2006]. Además, actúa en diversos puntos del ciclo celular y en la encapsidación pero no forma parte del virión maduro [Khalili et al., 2005; Suzuki et al., 2010]. El hecho de que los poliomavirus humanos emergentes no la posean hace pensar que existen diferencias respecto a la regulación de la maduración viral y las capacidades de transformar células [Johnson, 2010].

#### **2.3.2.2.3.-Otras proteínas tardías**

En el poliomavirus SV40 se produce una proteína adicional denominada VP4 que estimula la lisis celular y liberación viral [Daniels et al., 2007] (**Tabla 1.2.**). El BKPyV y el JCPyV contienen un posible marco de lectura para esta proteína que no está presente en el resto de poliomavirus humanos ni en el LPyV.

Por otra parte, en los poliomavirus de aves, existe un marco de lectura abierto adicional que codifica la proteína VP4 en una localización equivalente a la de la agnoproteína de los poliomavirus de mamíferos [Johne and Muller, 2003; Johne et al., 2006]. Dicha proteína está involucrada en el empaquetamiento del genoma viral y la inducción de apoptosis. A pesar del nombre, no presenta homología de secuencia con la proteína VP4 de SV40.

#### **2.3.2.2.4.- microARNs**

En el BKPyV, el JCPyV, el SV40 y el MCPyV, se ha visto que se generan microARNs que son complementarios de ARN mensajeros tempranos a los que se unen señalizándolos para que sean destruidos. De esta forma, al final de la infección viral, se regula negativamente la transcripción de los genes tempranos, como los que codifican el antígeno T [Seo et al., 2008; White et al., 2009].

#### **2.3.2.3.-LA REGIÓN REGULADORA**

La región reguladora contiene el ORI bidireccional y sitios de unión a factores de transcripción humanos que regulan la transcripción de los genes tempranos y tardíos [White et al., 2009].

La región reguladora de los poliomavirus humanos BK y JC muestra una diversidad genómica máxima entre cepas, la cual está caracterizada por mutaciones puntuales, deleciones y duplicaciones. Estas reorganizaciones afectan a las propiedades biológicas de dichos virus [Gosert

et al., 2010; Gosert et al., 2008; Moens et al., 1995; Moens and Van Ghelue, 2005]. En el resto de poliomavirus humanos, hasta el momento, sólo se han detectado mutaciones puntuales [Van Ghelue et al., 2012].

## **2.4.-LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS**

### **2.4.1.-DESCUBRIMIENTO DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS**

Los dos primeros poliomavirus humanos fueron descritos simultáneamente en el año 1971 por dos grupos de investigación independientes. Gardner y colaboradores detectaron uno de dichos virus en la orina de un paciente trasplantado renal que padecía estenosis uretral y cuyas iniciales B.K. sirvieron para denominar al poliomavirus BKPyV [Gardner et al., 1971]. El otro poliomavirus humano fue aislado por Padgett y colaboradores del cerebro de un paciente que padecía linfoma de Hodgkin y leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) y cuyas iniciales J.C. fueron utilizadas para nombrar al JCPyV [Padgett et al., 1971].

En el año 2007, dos grupos de investigación independientes obtuvieron la secuencia del genoma completo de dos nuevos poliomavirus humanos a partir del ADN extraído de aspirados nasofaríngeos. Su descubrimiento se llevó a cabo mediante amplificación al azar, clonaje y posterior secuenciación. Dichos poliomavirus fueron designados KIPyV [Allander et al., 2007] y WUPyV [Gaynor et al., 2007] por las iniciales de las instituciones en las que sendos virus fueron aislados, el Instituto Karolinska de Suecia y la Universidad de Washington, respectivamente.

En el año 2008, Feng y colegas detectaron, mediante pirosecuenciación, ADN viral en tumores de carcinoma de Merkel, un tipo raro y agresivo de tumores cutáneos. Se sospechaba la presencia de un agente infeccioso en dichos tumores ya que se dan con mucha mayor frecuencia en individuos inmunodeprimidos. El virus que fue detectado se denominó poliomavirus de células de Merkel (MCPyV) [Feng et al., 2008] y se distinguieron dos variantes, MCPyV339 y MCPyV350, debido a la divergencia entre sus genomas.

En el año 2010, dos poliomavirus humanos se identificaron en la piel de individuos sanos y se designaron como poliomavirus humanos 6 y 7, HPyV6 y HPyV7, asignándoles un número en función del orden en el que habían sido descubiertos respecto al resto de poliomavirus humanos [Schowalter et al., 2010]

En ese mismo año, se identificó un nuevo poliomavirus humano a partir de las lesiones en la piel de un paciente con tricodisplasia espinulosa, una rara enfermedad de la piel exclusiva de pacientes inmunodeprimidos. Se creía que un poliomavirus podía estar asociado a dicha enfermedad ya que, en las lesiones, se habían detectado, por microscopia electrónica, partículas similares a los

poliomavirus [Matthews et al., 2011]. Se trataba del denominado poliomavirus asociado a la tricodisplasia espinulosa (TSPyV) [van der Meijden et al., 2010].

Finalmente, en el año 2011, un nuevo poliomavirus humano relacionado con el LPyV fue detectado, mediante PCR, en muestras de sangre y orina de trasplantadas renales asintomáticos. Se le denominó poliomavirus humano 9, HPyV9 [Scuda et al., 2011].

Por otra parte, los poliomavirus de mono SV40 y LPyV han podido ser detectados en la población humana y existen ciertos indicios de que ambos virus podrían estar circulando en la misma. En 1960, se observó que algunas vacunas de poliovirus producidas en células de riñón de mono estaban contaminadas con el SV40 [Sweet and Hilleman, 1960]. Además, en los últimos años, se han detectado ADN de SV40 y anticuerpos frente al mismo en individuos sanos no vacunados frente a poliovirus y que no habían estado en contacto alguno con monos [Imperiale, 2007].

En el caso del LPyV, se trata de un virus que se aisló de una línea celular de linfoblastos provenientes de un mono verde africano. Su rango de hospedador parecía estar restringido a las líneas continuas de linfoblastos B pero, por PCR y serología, se ha podido comprobar, en estudios recientes, que podría estar circulando en la población humana [Delbue et al., 2010; Kean et al., 2009].

## **2.4.2.-EPIDEMIOLOGÍA DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS**

Los poliomavirus humanos se detectan en todo el mundo y, generalmente, la primoinfección tiene lugar en edades pediátricas salvo para el poliomavirus JC que ocurre en la pre-adolescencia [Johnson, 2010; Kean et al., 2009].

Para el BKPyV y el JCPyV se han detectado valores de seroprevalencia, en población general, del 82%-94% y del 39%-75%, respectivamente [Carter et al., 2009; Egli et al., 2009; Kean et al., 2009; Kjaerheim et al., 2007]. Sin embargo, mientras que la seropositividad para el virus BK alcanza valores del 95% aproximadamente a los 7-9 años de edad, la seroprevalencia frente al virus JC se incrementa más lentamente, y a los 9-11 años de edad se detectan valores del 51% [Lundstig and Dillner, 2006]. En cualquier caso, el patrón de infección del JCPyV parece variar entre poblaciones y, mientras que en algunas los anticuerpos anti-JCPyV se adquieren a la misma edad que ocurre para BKPyV, en otras la prevalencia sigue aumentando con la edad [Knowles, 2006].

Se ha detectado ADN tanto del BKPyV como del JCPyV, en riñones sanos, con frecuencias del 30%-50% en el caso del BKPyV y del 0%-10% en el caso del JCPyV [Chesters et al., 1983; Heritage et al., 1981; McCance, 1983; Tan et al., 2010]. Además, se ha descrito la excreción de los mismos, en la orina de individuos inmunocompetentes, con valores del 5%-7% en el caso del virus BK y del 15-20% en el caso del JCPyV [Egli et al., 2009; Hussein et al., 2010].

Sin embargo, y a pesar de la frecuente excreción de ambos virus en individuos inmunocompetentes, no se han podido detectar en sangre de los mismos pero si se han detectado, en linfocitos de la sangre periférica, [Azzi et al., 1996; Degener et al., 1997; Dorries et al., 1994] con porcentajes que oscilan entre el 7%-94% y del 0.9%-83%, respectivamente [Dolei et al., 2000; Dorries et al., 1994; Knowles, 2006].

La presencia de ADN del virus JC y del virus BK en cerebros sanos es controvertida. Para el JCPyV, la frecuencia global es aproximadamente del 30% [McCance, 1983; Perez-Liz et al., 2008; Tan et al., 2010; Vago et al., 1996; White et al., 1992] y, para el BKPyV, existen datos que oscilan entre el 0%-100% [De Mattei et al., 1995; Lam et al., 2010; Pietropaolo et al., 2003].

En el caso del JCPyV, se ha descrito la existencia de ADN del mismo, en individuos inmunocompetentes en muestras de amígdalas, médula ósea, bazo, nódulos linfáticos, tejido óseo [Kato et al., 2004; Monaco et al., 1998; Tan et al., 2009; Tan et al., 2010] y de tracto gastrointestinal [Laghi et al., 1999; Ricciardiello et al., 2001; Ricciardiello et al., 2000]. Por su parte, se ha detectado ADN del BKPyV, en múltiples órganos y tejidos, entre los que destacan los tejidos urogenitales como el cérvix uterino y la próstata, el bazo y el tejido óseo [De Mattei et al., 1995; Pietropaolo et al., 2003].

La seroprevalencia respecto al restante *Orthopolyomavirus* humano, el TSPyV, se midió en 528 individuos y se obtuvieron unos valores globales del 70% con un rango del 10% (niños menores de 3 años) al 80% (adultos de entre 50-59 años) [van der Meijden et al., 2011]. Estos datos se confirmaron en otro estudio similar [Chen et al., 2011].

En el caso de los *Wukipolyomavirus* humanos KI y WU, los valores de seropositividad en la población general son del 46%-90% y del 49%-98%, respectivamente [Carter et al., 2009; Kean et al., 2009; Neske et al., 2010; Nguyen et al., 2009]. La seroprevalencia frente a estos dos virus es comparable en edades adultas e infantiles aunque se observa que la frecuencia de individuos positivos frente al WUPyV aumenta con la edad [Kean et al., 2009].

Con respecto al MCPyV, se vio que la seroprevalencia en la población general era del 42%-77% [Carter et al., 2009; Kean et al., 2009; Tolstov et al., 2009; Touze et al., 2010]. En uno de los estudios de seroprevalencia, se observaron valores mucho menores frente a la variante 350 (25%) que respecto a la variante 339 (42%) [Kean et al., 2009]. La exposición frente al MCPyV parece tener lugar a edades pediátricas y se mantiene estable en la edad adulta [Carter et al., 2009; Kean et al., 2009].

Para el resto de *Wukipolyomavirus*, es decir HPyV6 y HPyV7, se obtuvieron valores de seroprevalencia del 69% y del 35%, respectivamente, en un estudio con 95 individuos [Schowalter et al., 2010].



La seroprevalencia frente al HPyV9 se ha evaluado en un estudio con 429 individuos, obteniéndose un valor global fue del 40% con un rango del 13% (niños entre 2 y 5 años) al 53% (adultos de 21-30 años) [Trusch et al., 2012].

Finalmente, la seroprevalencia en la población general frente a los virus de mono SV40 y LPyV presenta valores del 2%-4% y del 15%, respectivamente [Kean et al., 2009; Kjaerheim et al., 2007]. Se sabe que la seropositividad específica frente al SV40 y al LPyV alcanza los valores máximos a los 5-10 años de edad y se mantiene estable a lo largo del tiempo [Kean et al., 2009].

### **2.4.3.- PATOLOGÍAS EN HUMANOS ASOCIADAS A LOS VIRUS BK Y JC Y A OTROS POLIOMAVIRUS**

Los poliomavirus humanos, generalmente, infectan a sus hospedadores en la infancia sin síntomas asociados para establecer latencia, posteriormente. La producción de patología está casi restringida a la reactivación en pacientes inmunodeprimidos. Por ello, es necesario definir los siguientes conceptos [Hirsch, 2005]:

- ✓ La infección es la evidencia serológica o virológica de la exposición al poliomavirus humano, incluyendo replicación activa y latencia.
- ✓ La replicación es la evidencia de la multiplicación del poliomavirus humano al detectarse partículas infecciosas del virus, viriones, proteínas estructurales o ARN mensajero de dichas proteínas, o ADN viral libre en fluidos acelulares donde no se ha descrito la latencia del virus (ej. plasma o líquido cefalorraquídeo, LCR). Finalmente, también puede ser identificada, indirectamente, por medio de la evidencia citológica o histológica de los efectos de dicha replicación.
- ✓ La patología se define como la evidencia histológica de la existencia de enfermedad.

El poliomavirus BK se ha asociado con muy diversas patologías, principalmente, la nefropatía intersticial (NAPV) y la cistitis hemorrágica (CH) en trasplantados renales y de médula ósea, respectivamente. Recientemente, se ha relacionado con la aparición de encefalitis [Lopes da Silva, 2011a; Lopes da Silva, 2011b] y, más raramente, con el desarrollo de neumonía [Galan et al., 2005; Sandler et al., 1997]. La asociación con enfermedades autoinmunes es controvertida dada la dificultad para confirmar dichas patologías de forma histológica [Hirsch, 2005]. En el caso del lupus eritematoso, se ha sugerido que el poliomavirus BK puede dar lugar a autoinmunidad al inducir anticuerpos contra los complejos formados por el ADN viral y las histonas o el ADN viral y el antígeno T [Van Ghelue et al., 2003].

Por su parte, el poliomavirus humano JC es el agente etiológico de la LMP que afecta, principalmente, a pacientes VIH-positivos [Padgett et al., 1971]. También puede afectar a las células granulares del cerebelo provocando una patología denominada neuropatía de las células granulares asociada al JCPyV que cursa con atrofia cerebelar y ataxia [Du Pasquier et al., 2003; Tan and Koralnik, 2010]. Esporádicamente, se ha relacionado con la aparición de nefropatía intersticial y cistitis hemorrágica [Drachenberg et al., 2007; Mischitelli et al., 2010].

No está clara la asociación del BKPyV y, el JCPyV y el SV40 y el desarrollo de cáncer. Se sabe que éstos y el resto de poliomavirus humanos conocidos hasta la fecha codifican proteínas como los antígenos T y t con propiedades oncogénicas en cultivo celular y en modelos animales [Van Ghelue et al., 2012]. Además, diversos estudios han descrito la presencia de ADN o proteínas virales de los mencionados poliomavirus en varios tipos de tumores.

En concreto, la presencia del virus BK se ha identificado en tumores cerebrales, de vejiga, renales, de próstata y en adenocarcinomas [Abend et al., 2009a; De Mattei et al., 1995; Moens and Johannessen, 2008; Monini et al., 1995a; Monini et al., 1995b] mientras que el virus JC se ha detectado en tumores cerebrales, linfomas, leucemias, carcinomas colorectales y cáncer gástrico [Delbue et al., 2005a; Gibson et al., 1986; Laghi et al., 1999; Moens and Johannessen, 2008; Shin et al., 2006]. Por su parte, los resultados de la búsqueda del poliomavirus de monos SV40 en mesoteliomas humanos son muy dispares [Manfredi et al., 2005; Vilchez et al., 2003].

Hasta el momento, sólo el MCPyV ha podido asociarse de forma consistente con el desarrollo de cáncer en humanos, en concreto con el carcinoma de Merkel. El carcinoma de Merkel es un cáncer de piel raro pero muy agresivo que afecta a individuos inmunodeprimidos, con una incidencia de 1500 casos por año en los Estados Unidos de América [Lemos and Nghiem, 2007].

Feng y colaboradores lo detectaron en 8/10 carcinomas de Merkel evaluados y posteriores estudios confirmaron dicha frecuencia [Duncavage et al., 2009; Feng et al., 2008; Kassem et al., 2008; Sastre-Garau et al., 2009]. Además, el MCPyV está presente en los tumores como una copia integrada, mientras que el ADN viral detectado en células no tumorales es episomal. Asimismo, los MCPyV integrados en tumores poseen mutaciones en el antígeno T que dan lugar a que esté truncado. Las mutaciones observadas están ausentes de los MCPyV detectados en muestras no tumorales y afectan a los dominios implicados en la replicación viral y la unión a p53, pero no a la capacidad de transformación del virus [Feng et al., 2008; Sastre-Garau et al., 2009].

Por otra parte, el TSPyV, como su propio nombre indica, es el agente etiológico de la tricodisplasia espinulosa, una rara afección de la piel restringida a pacientes inmunodeprimidos. La tricodisplasia espinulosa se caracteriza por el desarrollo de pápulas foliculares, espinas de queratina denominadas espículas, y alopecia facial que distorsionan los rasgos faciales de los que la padecen

dándoles una apariencia leonina [van der Meijden et al., 2010]. A fecha de agosto del 2011, sólo se habían descrito 15 casos de este tipo de patología [van der Meijden et al., 2011].

No se ha encontrado relación entre el resto de poliomavirus y la producción de patología en humanos aunque en el caso de los poliomavirus humanos emergentes no puede ser descartada todavía. De hecho, debido a la detección de poliomavirus KIPyV y WUPyV en pacientes con infección respiratoria aguda se especuló un posible papel de los mismos como agentes etiológicos [Allander et al., 2007; Bialasiewicz et al., 2007; Gaynor et al., 2007]. Sin embargo, en varios estudios, no se han encontrado diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de detección del KIPyV y del WUPyV en los pacientes con infección respiratoria aguda respecto de los individuos control [Norja et al., 2007; Wattier et al., 2008]. Además, frecuentemente, se detecta coinfección con otros virus respiratorios por lo que es difícil saber si los síntomas asociados se deben a los mencionados poliomavirus humanos [Allander et al., 2007; Babakir-Mina et al., 2011; Bialasiewicz et al., 2007; Gaynor et al., 2007].

#### **2.4.3.1.-NEFROPATÍA INTERSTICIAL**

##### **2.4.3.1.1.-Epidemiología**

La NAPV es la principal complicación clínica asociada al BKPyV, la cual afecta, principalmente, a trasplantados renales. Se caracteriza por una nefropatía intersticial inflamatoria que aparece generalmente a los 10-13 meses postrasplante asociada a la reactivación del BKPyV [Bennett et al., 2012]. En el 10%-60% de los receptores de trasplante renal, se ha observado excreción urinaria del BKPyV [Anzivino et al., 2011; Drachenberg et al., 2007; Randhawa and Brennan, 2006; Saundh et al., 2010] pero sólo en el 1% al 10 % de los mismos la reactivación del BKPyV desemboca en el desarrollo de nefropatía intersticial [Hirsch, 2005]. La pérdida del órgano trasplantado tiene lugar en el 50% de los pacientes afectados [Cimbaluk et al., 2009; Mengel et al., 2003].

El agente etiológico que más frecuentemente produce NAPV es el poliomavirus BK pero un porcentaje menor al 3% de los casos son debidos al JCPyV [Drachenberg et al., 2007; Hirsch et al., 2005; Kazory et al., 2003].

##### **2.4.3.1.2.-Histopatología y clínica**

La NAPV se debe a la replicación del BKPyV en el órgano trasplantado la cual causa lesiones en que se caracterizan por: (i) la aparición de cuerpos de inclusión intranucleares en las células epiteliales y (ii) daño y lisis celular del epitelio tubular. Estos hallazgos se consideran el signo histológico de la infección productiva que, además, correlacionan con el grado de disfunción renal [Nickeleit and Mihatsch, 2006].

Las lesiones tubulares muestran una distribución focal que, a menudo, afecta a la médula renal y se extienden de forma ascendente a lo largo de las nefronas conforme progresa la enfermedad [Ramos et al., 2009]. El daño citopático puede alcanzar la pelvis renal, los uréteres o la vejiga [Nickeleit and Mihatsch, 2006].

Asimismo, la nefropatía se caracteriza por la aparición en la orina de un gran número de células con inclusiones virales denominadas células señuelo (*decoy cells*). Son células infectadas que son liberadas a la orina a partir de los túbulos renales [Hirsch et al., 2006; Nickeleit and Mihatsch, 2006].

Histológicamente, la NAPV presenta tres patrones caracterizados por la identificación y extensión del infiltrado inflamatorio y la fibrosis asociados a la infección [Nickeleit and Mihatsch, 2006]:

Patrón A) Cambios citopáticos en el parénquima renal normal. Ausencia o presencia insignificante de infiltrado inflamatorio y fibrosis.

Patrón B) Combinación de cambios citopáticos virales y áreas de fibrosis asociadas a la infección viral e inflamación focal o multifocal. Los estadios B1, B2 y B3 se caracterizan por presencia de fibrosis en menos 2,5%, en un 26%-50% y en más de un 50%, respectivamente.

Patrón C) Pocos cambios citopáticos pero amplias áreas de infiltrado inflamatorio y fibrosis asociadas a la infección.

Los síntomas asociados a la nefropatía intersticial están limitados al órgano trasplantado. Los riñones originales del receptor del trasplante no se ven afectados por la patología que, por otra parte, cursa sin las molestias típicamente asociadas a una infección, como la fatiga o la fiebre [Nickeleit et al., 2006].

Dependiendo del grado de daño tubular asociado a la replicación viral, los pacientes presentan grados variables de disfunción renal, la cual se puede medir por los valores de la creatinina sérica. Dichos niveles varían desde la normalidad (patrón histológico A) hasta alcanzar niveles marcadamente elevados (patrones histológicos B y C) [Buehrig et al., 2003; Ramos et al., 2009]. La última fase de la enfermedad está caracterizada por atrofia tubular, fibrosis intersticial e inflamación con el consecuente fallo renal y pérdida del órgano trasplantado [Nickeleit and Mihatsch, 2006].

En algunos estudios, se ha asociado la replicación del BKPyV en los trasplantados renales con la aparición de estenosis uretral. Sin embargo, recientemente, apenas existen referencias en la literatura [Hirsch, 2005]. La forma de colocar los *stents* ureterales se asocia de forma significativa con la aparición de viremia debida al BKPyV [Brennan et al., 2005]. Por ello, se puede especular

que la estenosis uretral se debe al daño local en los uréteres, debido al procedimiento quirúrgico, que provoca la reactivación del virus BK. Con la mejora en las técnicas quirúrgicas esta afección se ha reducido sustancialmente [Hirsch, 2005].

#### **2.4.3.1.3.-Patogenia**

La patogenia de la NAPV depende de la interacción entre múltiples factores asociados a (a) El tratamiento inmunosupresor. (b) El receptor del trasplante; (c) El donante del trasplante; (d) El órgano trasplantado; (e) Secuencia específica del genoma del BKPyV.

##### **a) Tratamiento inmunosupresor**

El principal factor desencadenante de la NAPV es el elevado estado de inmunodepresión provocado en el paciente por el uso de inmunosupresores que evitan el rechazo. Los inmunosupresores de tercera generación, en concreto la combinación tacrolimo, micofenolato mofetil y coricosteroides parecía haber aumentado el riesgo de replicación del BKPyV del NAPV [Brennan et al., 2005; Mengel et al., 2003]. Sin embargo, se cree que es el grado de inmunodepresión, alto y prolongado, y, no la droga en sí misma, lo que determina el riesgo de desarrollo de la NAPV [Cimbaluk et al., 2009; Ramos et al., 2002].

##### **b) Factores asociados con el receptor**

La edad (> 50 años) [Ramos et al., 2002], el género (masculino), etnia (caucásica), padecer diabetes mellitus [Trofe et al., 2003] o la seronegatividad frente al BKPyV en pacientes pediátricos [Ginevri et al., 2003; Smith et al., 2004] están asociados a mayor riesgo de NAPV. Sin embargo, el hecho de que el receptor sea seropositivo tampoco le protege, necesariamente, frente al desarrollo de patología [Hirsch et al., 2002].

##### **c) Factores asociados con el donante**

El hecho de que sea seropositivo o el alto número de incompatibilidades en los antígenos leucocitarios humanos (HLA) entre el donante y el receptor, también, determinan un mayor riesgo de aparición de la patología [Awadalla et al., 2004; Brennan et al., 2005].

##### **d) Factores asociados al órgano trasplantado**

La NAPV es mucho más común en los receptores de trasplante renal dado que suele afectar a los riñones trasplantados y no a los riñones originales del receptor. Los escasos casos de NAPV en trasplantes no renales se dan generalmente en trasplantados de corazón y pulmón [Limaye et al., 2005; Schwarz et al., 2005].

e) Determinantes virales

Se ha sugerido que la existencia de ciertas reorganizaciones en la región reguladora o mutaciones presentes en la proteína VP1 del BKPyV aumenta las capacidades citopáticas y de replicación del virus [Gosert et al., 2008; Randhawa et al., 2002].

Cuando existe predisposición a que se desarrolle NAPV de acuerdo a los factores de riesgo previamente descritos y sin intervención clínica, el virus BK latente en el órgano trasplantado se reactiva, especialmente cuando la carga viral es alta, dando lugar a una infección productiva [Dharnidharka et al., 2011; Nicleleit et al., 2003; Nicleleit et al., 2006] (**Figura 2.4.**).



**Figura 2.4.-** Patogenia de la NAPV asociada a la infección por el BKPyV.

Adaptado de Dharnidharka et al., 2011.

El comienzo de la patología está asociado a la excreción urinaria del BKPyV de forma asintomática [Ramos et al., 2009]. Una vez que la replicación viral entra en la fase lítica con necrosis de las células del epitelio tubular y las partículas virales acceden al torrente sanguíneo vía los capilares peritubulares, la presencia del BKPyV es detectable en plasma [Nicleleit et al., 2006]. La viremia predice el deterioro de la función renal y está fuertemente asociada con graves manifestaciones histológicas de la infección viral [Hirsch et al., 2002; Nicleleit et al., 2000; Ramos et al., 2009]. En la última fase, el daño renal debido a la replicación viral se une a la inflamación que puede desembocar en fallo renal y rechazo del trasplante [Hirsch, 2005; Ramos et al., 2009]

### **2.4.3.2.-CISTITIS HEMORRÁGICA**

#### **2.4.3.2.1.-Epidemiología**

La CH asociada a la infección por poliomavirus afecta al 10%-25% de los trasplantados de médula ósea, generalmente, a las dos semanas postrasplante [Bennett et al., 2012]. El poliomavirus BK es el principal agente etiológico de la CH, el cual se reactiva y se excreta por la orina en un 55% de los trasplantados de médula ósea [Azzi et al., 1994; Bedi et al., 1995; Dropulic and Jones, 2008]. Sin embargo, el poliomavirus JC y otros virus como el citomegalovirus (CMV) y el adenovirus también pueden producir CH [Akiyama et al., 2001; Garcia Ligerio et al., 2002; Gorczynska et al., 2005; Mischitelli et al., 2010; Spach et al., 1993].

#### **2.4.3.2.2.- Clínica y patología**

La CH es un síndrome caracterizado por disuria, frecuencia y urgencia al orinar y hematuria debidos a la inflamación de la mucosa de la vejiga por la replicación del poliomavirus BK. También puede ir acompañada de dolor suprapúbico variable [Bennett et al., 2012].

En función del grado de hematuria se puede clasificar la cistitis hemorrágica en diferentes grados de gravedad [Droller et al., 1982]:

Grado 1) Hematuria microscópica

Grado 2) Hematuria macroscópica

Grado 3) Hematuria macroscópica con pequeños coágulos

Grado 4) Hematuria grave con coágulos que producen obstrucción urinaria los cuales requieren intervención quirúrgica para ser eliminados

Los casos leves de CH se resuelven a las dos semanas del tratamiento. Sin embargo, los casos más serios pueden derivar en obstrucción urinaria debida a los coágulos, sangrados incontrolables y fallo renal agudo. En raras ocasiones, los pacientes mueren [Dropulic and Jones, 2008].

#### **2.4.3.2.3. Patogenia**

Los principales factores que determinan un mayor riesgo de padecer CH son los siguientes:

- a) Presencia de Inmunoglobulinas G frente al BKPv antes del trasplante [Wong et al., 2007].
- b) Tipo de régimen inmunosupresor (intensidad total frente a intensidad reducida).
- c) Trasplante alogénico [Leung et al., 2002].
- d) Tipo de donante (pariente frente a no emparentado).

e) Enfermedad injerto contra huésped aguda [Leung et al., 2002; Leung et al., 2005b].

f) Incrementos en la carga viral en orina altos o mayores de 3 logaritmos [Bogdanovic et al., 2004; Wong et al., 2007].

La patogénesis de la CH pasa por varias fases. En primer lugar, la quimio o radioterapia empleados en el tratamiento pretrasplante producen daño en el uroepitelio que promueve la replicación del BKPyV. En el contexto de la inmunosupresión y, por tanto, de ausencia de inmunidad funcional, la replicación del BKPyV puede producir más daño a las células.

Finalmente, en el periodo postrasplante, debido a la reconstitución inmune con la consiguiente recuperación de la inmunidad frente al virus BKPyV, se cree que los antígenos virales presentes en la pared de la vejiga son reconocidos por los linfocitos emergentes pudiendo producir daño en la mucosa de la vejiga y hemorragia [Bedi et al., 1995; Dropulic and Jones, 2008; Hirsch, 2005].

#### **2.4.3.3.- LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA**

##### **2.4.3.3.1.-Epidemiología**

La LMP es debida, generalmente, a la reactivación del poliomavirus JC en pacientes VIH-positivos, los cuales representan un 90% de los casos [Berger, 2007]. A pesar de que la introducción de la terapia retroviral altamente activa ha disminuido la frecuencia de la LMP en los pacientes VIH-positivos, la incidencia de dicha patología se mantiene alta, con valores entre el 3%-5% [Carson et al., 2009b]. En la literatura, hay descritos dos casos de LMP debida al BKPyV en ausencia del poliomavirus JC [Cabrejo et al., 2005; Hix et al., 2004].

Por otra parte, existen otras enfermedades y situaciones en las que la inmunidad mediada por células T se ve comprometida y que también predisponen al desarrollo de LMP. Es el caso de la leucemia, el linfoma, el trasplante de órganos, el tratamiento de los tumores sólidos, las enfermedades autoinmunes, los desórdenes granulomatosos, la agammaglobulinemia y determinados desórdenes hereditarios del Sistema Inmune (SI) [Berger, 2007; Brooks and Walker, 1984].

Recientemente, se han descrito casos de LMP en pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con nuevas terapias de anticuerpos monoclonales, generalmente con natalizumab, el cual se emplea en el tratamiento de la esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn [Clifford et al., 2010]. El riesgo asociado al natalizumab de que se desarrolle LMP es de 1:1000 [Yousry et al., 2006]. Otros anticuerpos monoclonales que han sido asociados con el aparición de LMP son el rituximab y el efalizumab [Carson et al., 2009a; Schwab et al., 2012]. El rituximab se emplea en el tratamiento de enfermedades lifoproliferativas y diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide,



el lupus sistémico eritematoso y la esclerosis múltiple. Por su parte, el efanzulimab se usa para tratar a los pacientes con psoriasis severa en placa.

Además, de la LMP clásica se ha descrito un tipo de LMP asociado al Síndrome de Reconstitución Inmune Inflamatorio (SRI). En el caso de los enfermos VIH-positivos, tiene lugar una vez que se le empieza a tratar con la terapia antirretroviral altamente activa (TAAA) y, en el de los VIH-negativos, al retirarse el tratamiento con las drogas inmunomoduladoras. Este tipo de LMP constituye hasta el 23% de los casos de LMP diagnosticados en pacientes VIH-positivos [Cinque et al., 2009].

#### **2.4.3.3.2.-Histopatología y clínica**

La LMP es una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central (SNC) debida a la infección lítica de los oligodendrocitos productores de mielina por el poliomavirus JC.

Las tres características patológicas más importantes de la LMP son los siguientes [Astrom et al., 1958; Berger, 2007]:

- a) Lesiones desmielinizantes que tienen lugar en focos distribuidos por la sustancia blanca cortical y subcortical debidas a la infección de los oligodendrocitos por el JCPyV.
- b) Células de la oligodendroglia con núcleos anormalmente alargados e hipercromáticos.
- c) Astroцитos alargados con el núcleo lobulado e hipercromático denominados “bizarros”.

En los oligodendrocitos infectados, se pueden observar viriones del JCPyV mediante un microscopio electrónico o inmunohistoquímica [Silverman and Rubinstein, 1965; Zurhein and Chou, 1965]. Además, en las lesiones, a menudo, se detectan macrófagos que se encargan de eliminar los productos de lisis de la mielina u oligodendrocitos dañados [Astrom et al., 1958; Berger, 2007].

Con el progreso de la enfermedad, cada foco crece debido a que el virus infecta y lisa nuevas células. En las últimas fases de la enfermedad, las áreas de necrosis se convierten en lesiones macroscópicas que pueden presentar diámetros de incluso centímetros [Astrom et al., 1958; Berger, 2007]. Las lesiones afectan al cerebro, cerebelo y tronco encefálico, especialmente, en la unión entre las materias gris y blanca [Berger, 2007; Whiteman et al., 1993].

En la LMP asociada a SRI, además de las lesiones desmielinizantes, se observan infiltrados inflamatorios de linfocitos [Tan and Koralnik, 2010].

Dada la naturaleza multifocal de las lesiones, la LMP se presenta asociada a una gran variedad de síntomas clínicos entre los cuales la debilidad y las alteraciones cognitivas son los más extendidos. Otros síntomas comunes incluyen la afasia, las alteraciones en la deambulación, la cefalea, las

alteraciones visuales, la parestesia y los ataques de apoplejía. En general, los síntomas son comunes a los pacientes VIH-positivos y a los que no lo son [Berger, 2007].

La enfermedad progresa rápidamente y los afectados mueren generalmente en menos de un año tras el diagnóstico aunque algunos sobreviven varios años [Kepes et al., 1975; Tan and Koralnik, 2010].

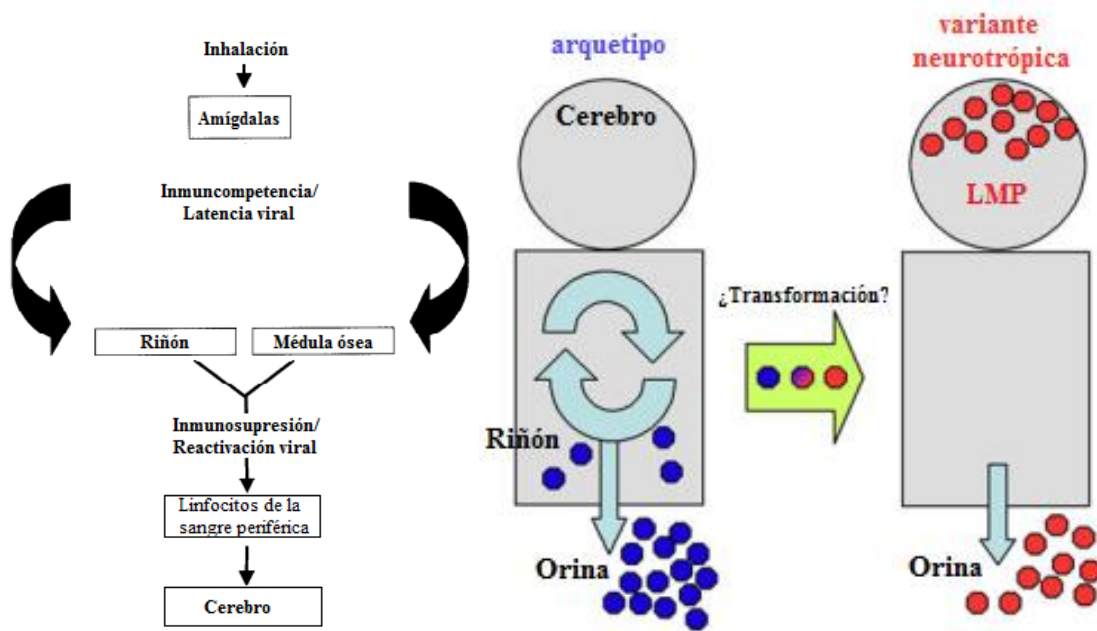
#### **2.4.3.3.-Patogenia**

La patogenia de la LMP no se ha clarificado por completo aunque se conocen algunos aspectos de la misma. Las cepas del JCPyV cuya región reguladora presenta una conformación sin reorganizaciones en la región reguladora se denominan arquetípicas y son las únicas que se han detectado en la orina y en riñón de pacientes sanos. Además, no parecen estar asociadas al desarrollo de LMP [Marshall and Major, 2010; Yogo et al., 2008a] y no son infecciosas en cultivos de células gliales [Daniel et al., 1996].

En cerebro y LCR de pacientes con LMP, sólo se han detectado variantes reorganizadas del JCPyV [Vaz et al., 2000; White and Khalili, 2011]. Además, al analizar las regiones reguladoras reorganizadas de algunas de estas variantes detectadas en el LCR de pacientes con LMP, en células gliales y astrocitos, se vio que presentaban una mayor capacidad de replicación y una expresión de los genes tempranos incrementada respecto a la forma arquetípica [Gosert et al., 2010].

Teniendo en cuenta la anterior, se propone un modelo para la patogenia del JCPyV en la producción de la LMP. El virus JC podría entrar en el organismo vía el tracto respiratorio y pasar a las amígdalas o bien por el tracto gastrointestinal, ya que se ha sido detectado en ambas localizaciones [Monaco et al., 1998; Ricciardiello et al., 2000] (**Figura 2.5. a**). Tras un proceso de viremia primaria, se cree que el virus JC establecería latencia en el riñón, médula ósea, amígdalas, linfocitos de la sangre periférica y, de forma más controvertida, en el cerebro [Dorries et al., 1994; Marzocchetti et al., 2008; Monaco et al., 1998; Tan et al., 2010].

En condiciones de inmunosupresión severa, el virus se reactivaría y replicaría, generándose reorganizaciones al azar (**Figura 2.5. b**). Aquellas variantes reorganizadas con una ventaja replicativa se convertirían en las cepas predominantes. Se han detectado variantes reorganizadas en linfocitos de la sangre periféricas de pacientes con LMP [Delbue et al., 2005b; Marzocchetti et al., 2008] lo que apoyaría la hipótesis de que dichas variantes podrían migrar de la sangre al cerebro dando lugar a la patología [Marshall and Major, 2010; Sabath and Major, 2002; Shishido-Hara, 2010; White and Khalili, 2011].



**Figura 2.5.- a)** Diagrama del tropismo del JCPyV al producir LMP; **b)** Hipótesis del arquetipo para explicar la patogenia de la LMP.

Adaptado de Sabbath and Major, 2002 y tomado de Shishido-Hara, 2010, respectivamente.

En los pacientes VIH-positivos, existen factores añadidos que podrían determinar el riesgo incrementado de desarrollar LMP:

a) Disminución en las células T CD4+

La inmunidad mediada por células parece, de hecho, ser un factor determinante para la aparición del LMP y los pacientes VIH-positivos presentan como resultado de la infección un descenso en las células CD4+. Se ha observado, además, que los pacientes VIH-positivos con < 200 células T CD4+/μL tienen mayor riesgo de desarrollar la patología [Engsig et al., 2009]. Asimismo, los pacientes con mayores niveles de células T anti-JCPyV sobreviven más tiempo [Berger et al., 1998; Gasnault et al., 2003].

b) Rotura de la barrera hematoencefálica

La infección con el VIH puede determinar una rotura de dicha barrera que facilitaría que el virus JCPyV presente en la sangre alcanzase el SNC [Berger, 2006].

c) Activación del JCPyV vía la proteína Tat

Se ha visto que la proteína Tat del VIH activa la replicación y la transcripción de los genes tardíos del JCPyV [Daniel et al., 2001; Krachmarov et al., 1996].

En la LMP asociada a SRI, se produce una respuesta inflamatoria frente al JCPyV asociada a la recuperación del SI tras un periodo de inmunosupresión como ocurre al iniciarse el tratamiento con TAAA, en los pacientes VIH-positivos, o tras el cese del tratamiento inmunosupresor, en los

pacientes VIH-negativos [Tan and Koralnik, 2010]. A pesar de que los linfocitos T son capaces de controlar la replicación del JCPyV por debajo de niveles detectables, la excesiva reacción de los linfocitos T CD8+ anti-JCPyV en las lesiones desmielinizantes fuera del control de los linfocitos CD4+, que están prácticamente ausentes de dichas lesiones, da lugar a la LMP-SRI [Vendrely et al., 2005].

El mecanismo por el cual se desencadena la LMP en los pacientes tratados con natalizumab no se conoce completamente aunque se sabe que el natalizumab hace disminuir el número de células dendríticas y linfocitos T CD4+ en el SNC [del Pilar Martin et al., 2008]. Este efecto deseado para controlar la esclerosis múltiple puede dar lugar a una inmunodepresión a nivel del SNC [Carson et al., 2009b]. Como se ha comentado anteriormente la inmunosupresión es uno de los principales factores desencadenantes de la LMP [Berger, 2007].

#### **2.4.3.4.- INFECCIÓN NEUROLÓGICA DEBIDA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

##### **2.4.3.4.1.-Epidemiología**

A comienzos del año 2011 y desde que se publicara el primer caso de infección neurológica debida al BKPyV, sólo se han descrito 26 casos de este tipo de patología [Behre et al., 2008; Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Cabrejo et al., 2005; Ferrari et al., 2008; Friedman and Flanders, 2006; Garavelli and Boldorini, 2002; Hedquist et al., 1999; Hix et al., 2004; Jorgensen et al., 2003; Kinnaird and Anstead, 2010; Lesprit et al., 2001; Lopes da Silva, 2011b; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007; Voltz et al., 1996].

La mayoría de los casos se dan en condiciones de inmunosupresión, especialmente en pacientes VIH-positivos (8 casos) [Bratt et al., 1999; Garavelli and Boldorini, 2002; Jorgensen et al., 2003; Kinnaird and Anstead, 2010; Lesprit et al., 2001; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007] y trasplantados de médula ósea o en tratamiento con quimioterapia debido a enfermedades onco-hematológicas (7 casos) [Behre et al., 2008; Behzad-Behbahani et al., 2003a; Ferrari et al., 2008; Friedman and Flanders, 2006; Lopes da Silva et al., 2011; Stoner et al., 2002]. También existe un caso en un trasplantado renal y otro en un paciente en tratamiento durante mucho tiempo con esteroides [Cabrejo et al., 2005; Hix et al., 2004]. Sin embargo, también hay casos en individuos inmunocompetentes (9 casos) [Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Voltz et al., 1996].

Hasta hace relativamente poco tiempo, el JCPyV era el único poliomavirus humano neurotrópico conocido [Feigenbaum et al., 1987; Schweighardt and Atwood, 2001]. Mientras que el poliomavirus BK se ha relacionado con la aparición de nefropatía intersticial y cistitis hemorrágica, el virus JC es capaz de infectar el SNC y se asocia de manera inequívoca con el desarrollo de LMP

[Arthur et al., 1988; Padgett et al., 1971; Rosen et al., 1983]. Dado que el estudio de la infección por el BKPyV no es habitual en el diagnóstico de síndromes neurológicos, el papel del mismo en la etiología de dichas enfermedades puede haberse subestimado.

Sin embargo, el virus BK ha podido ser detectado en el LCR y en el cerebro de individuos inmunocompetentes e inmunodeprimidos asociado o no a síntomas clínicos [Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Lesprit et al., 2001; Pietropaolo et al., 2003; Vago et al., 1996; Vallbracht et al., 1993; Voltz et al., 1996]. Recientemente, Lopes da Silva ha recopilado todos los casos publicados en la literatura y define al BKPyV como un patógeno oportunista del SNC [Lopes da Silva, 2011a; Lopes da Silva, 2011b].

#### **2.4.3.4.2. Clínica**

La infección neurológica debida al BKPyV cursa con escasa o nula implicación clínica en los individuos inmunocompetentes pero es, generalmente, mortal en los individuos inmunodeprimidos, ya que produce fallo multiorgánico [Behre et al., 2008; Bratt et al., 1999; Garavelli and Boldorini, 2002; Hedquist et al., 1999; Jorgensen et al., 2003; Lesprit et al., 2001; Lopes da Silva, 2011b; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993].

En los individuos inmunodeprimidos, el cuadro neurológico más común es la encefalitis (18 casos) que en muchos pacientes está ligada a meningitis (9 casos) [Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Garavelli and Boldorini, 2002; Hedquist et al., 1999; Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007]. Asimismo, en varios de los pacientes hay afectación del tracto genitourinario y padecen cistitis hemorrágica (5 casos) o nefritis (6 casos) [Behre et al., 2008; Bratt et al., 1999; Friedman and Flanders, 2006; Hedquist et al., 1999; Hix et al., 2004; Jorgensen et al., 2003; Kinnaird and Anstead, 2010; Lesprit et al., 2001; Lopes da Silva et al., 2011; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993]. Tres de los pacientes VIH-positivos padecían también retinitis [Bratt et al., 1999; Hedquist et al., 1999; Jorgensen et al., 2003].

También se han descrito dos casos de LMP, uno en un trasplantado renal y otro en un individuo en terapia a largo plazo con esteroides, en los que se detectó ADN del BKPyV en LCR mientras que la PCR frente al JCPyV y a otros microorganismos resultó negativa [Cabrejo et al., 2005; Hix et al., 2004].

Los síntomas más comunes son cefaleas, ataques de apoplejía, deterioro mental, afasia, alteraciones en la visión y alucinaciones [Lopes da Silva, 2011b]. En los pacientes pediátricos, se manifiesta, normalmente, con irritabilidad y letargia [Behzad-Behbahani et al., 2003b].

#### 2.4.3.4.3. Patogenia

No hay datos suficientes para conocer el mecanismo por el cual se originan este tipo de infecciones. Por un lado, el virus BK latente en cerebro podría reactivarse y dar lugar a la patología o bien podría replicar en los linfocitos de la sangre periférica generando una variante neurotrópica capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro.

Sólo se conocen las secuencias de la región reguladora del BKPyV obtenidas a partir del LCR y la orina y otros tejidos de dos pacientes con infección neurológica debida al BKPyV. Uno de ellos es un paciente con leucemia, meningoencefalitis y NAPV y el otro es un paciente VIH-positivo que, además de meningoencefalitis y nefritis, padece retinitis [Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002]. En ambos casos, se detectaron variantes reorganizadas en LCR similares a las del JCPyV asociadas con LMP, mientras que las formas identificadas los linfocitos de sangre periférica así como las variantes excretadas en orina eran arquetípicas. Por ello, los autores han especulado con que dichas reorganizaciones puedan ser necesarias para que el virus replique de forma eficiente en el SNC.

Sin embargo, dado el reducido número de pacientes evaluados, implica que son necesarios estudios adicionales para llegar a conclusiones más fiables.

Finalmente, se muestra una recopilación de los distintos patrones patogénicos de las enfermedades en humanos causadas por poliomavirus humanos (**Tabla 2.3.**):

**Tabla 2.3.-** Patrones de las principales patologías asociadas a la replicación de poliomavirus humanos o a su respuesta inmune.

	Capacidad de transformación	Efecto citopático	Efecto citopático e inflamatorio	Reconstitución inmune	Autoinmunidad
<b>Concepto</b>	- Integración viral en cromosoma humano  - Ag T truncado	- Replicación predominante de poliomavirus	- Replicación de poliomavirus unida a respuesta inmune	- Respuesta inmune predominante	- ¿Respuesta inmune aberrante debida a complejos ADN viral-histonas o ADN viral-AgT?
<b>Ejemplos</b>	- Carcinoma de Merkel (MCPyV)	- LMP (JCPyV)  - NAPV patrón A (BKPyV)	- NAPV patrón B (BKPyV)	- LMP asociada al SRI (JCPyV)  - Cistitis hemorrágica (BKPyV)	- ¿Lupus sistémico debido al BKPyV?

Tomado de Hirsch, 2005.

## **2.5.- DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS BK Y JC**

Las técnicas de diagnóstico por aislamiento no se emplean en el diagnóstico de la infección por los poliomavirus humanos BK y JC ya que dichos virus crecen de forma lenta e ineficaz incluso en células susceptibles [Boothpur and Brennan, 2010; de Oña Navarro, 2006]. Por otra parte, la detección indirecta de anticuerpos específicos frente al BKPyV o al JCPyV tampoco es útil, teniendo en cuenta los altos valores de seroprevalencia detectados en las poblaciones humanas y a que producen patología en individuos inmunodeprimidos [Egli et al., 2009; Kjaerheim et al., 2007].

Por todo ello, hasta hace relativamente poco, las únicas técnicas válidas para el diagnóstico de la infección por el BKPyV y por el JCPyV eran la inmunohistoquímica en biopsias renales y en biopsias de cerebro y la microscopia electrónica en este tipo de muestras y en otras menos invasivas como la orina y el LCR [de Oña Navarro, 2006]

### **2.5.1.-TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO BASADAS EN DETECCIÓN GENÓMICA. PCR CONVENCIONAL Y PCR A TIEMPO REAL**

Con el desarrollo de las técnicas de detección genómica, el diagnóstico de la infección de los poliomavirus humanos BK y JC se empezó a llevar a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR [Bechert et al., 2010; Smith et al., 2007]. La PCR ofrece muchas ventajas como la rapidez, la alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de incluir un control interno que permita comprobar las posibles inhibiciones de las muestras clínicas [Niesters, 2004].

Asimismo, la PCR múltiple, es decir aquella que incluye cebadores para amplificar de forma específica varias dianas, permite discriminar la presencia del BKPyV y del JCPyV en una sola reacción de amplificación. Esta técnica es muy útil para llevar a cabo un diagnóstico diferencial en patologías como la NAPV o las infecciones neurológicas en las que ambos virus pueden ser los agentes causales [Bergallo et al., 2007; Fedele et al., 1999]. También pueden servir para detectar coinfecciones, las cuales son relativamente frecuentes en la NAPV [Baksh et al., 2001; Drachenberg et al., 2007].

Actualmente, las técnicas de PCR a tiempo real se están imponiendo ya que permiten cuantificar la carga viral presente en las muestras clínicas. La cuantificación de la carga viral puede servir, de forma potencial, para detectar la infección de forma temprana, predecir la aparición de patología y monitorizar la evolución de la enfermedad [Smith et al., 2007]. En la literatura, existen algunas técnicas de PCR a tiempo real capaces de detectar y cuantificar de forma específica y simultánea el

genoma del BKPyV así como el del JCPyV [Dumonceaux et al., 2008; Funahashi et al., 2010; Palmieri et al., 2010; Saundh et al., 2010].

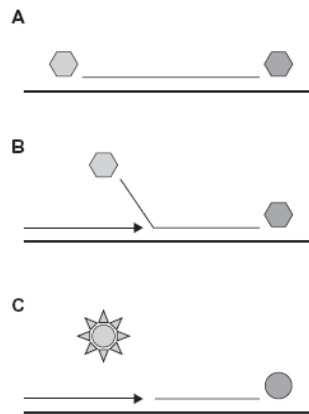
En concreto, en el contexto de la NAPV, la cuantificación de la carga viral del BKPyV, se emplea en el diagnóstico y la monitorización de trasplantados renales [Bechert et al., 2010; Hirsch et al., 2005; Ramos et al., 2009]. Además, se ha visto que la viremia del BKPyV es significativamente mayor en los trasplantados renales que padecen nefropatía que en los que no [Hirsch et al., 2002]. Asimismo, el riesgo de desarrollar cistitis hemorrágica parece ser mayor en aquellos pacientes en los que se produce un incremento significativo de la viruria del BKPyV y en aquellos en los que se supera un determinado umbral de viremia [Erard et al., 2005; Wong et al., 2007]. En el contexto de la LMP, se ha demostrado que existe una relación significativa entre cargas bajas del JCPyV en LCR y una mayor supervivencia de los pacientes [Taoufik et al., 1998; Yiannoutsos et al., 1999]. Finalmente, el significado de la carga viral del BKPyV en las infecciones neurológicas no ha sido investigado.

Respecto a la técnica convencional, la PCR a tiempo real es igual o más sensible, más específica y más rápida. Por un lado, el empleo de sondas fluorescentes y de sistemas de detección de última generación determina que la PCR a tiempo real presente una sensibilidad igual e incluso mayor que las técnicas de PCR anidada (*nested PCR*) y una mayor especificidad [Espy et al., 2006; Mackay et al., 2002]. Por otro lado, mientras que la técnica convencional está ligada al uso de geles, en los que se visualiza el resultado una vez finalizada la reacción, en la PCR a tiempo real la reacción se valora mientras tiene lugar. De esta forma, se disminuye el tiempo de espera hasta el resultado final y se puede cuantificar el producto amplificado [Gunson et al., 2006; Mackay, 2004].

En la PCR a tiempo real, al igual que en la PCR convencional, se emplean unos oligonucleótidos que son homólogos a una región determinada del genoma viral y que permiten la amplificación de dicha secuencia. La sonda o sondas se unen de forma sensible y específica a una secuencia del genoma viral interna a aquella amplificada por los cebadores y emiten fluorescencia la cual es detectada por las plataformas de PCR a tiempo real [Mackay, 2004].

Las sondas más empleadas en la cuantificación de la carga viral son las sondas TaqMan o sondas de hidrólisis. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada. En consecuencia, para que dicha sonda emita fluorescencia el donador y el aceptor han de encontrarse suficientemente separados, es decir, la sonda ha de romperse (**Figura 2.6.**). Cuando la sonda hibrida con el fragmento sintetizado durante la reacción de amplificación es hidrolizada por la actividad 5'exonucleasa de la ADN polimerasa y emite fluorescencia [Costa, 2004; Kubista et al., 2006].



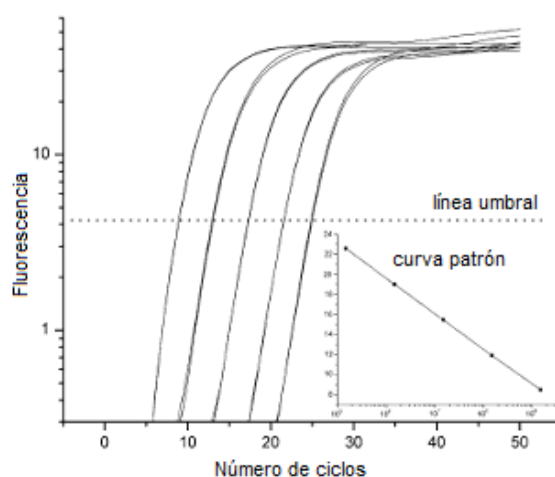


**Figura 2.6.-** Mecanismo de las sondas de hidrólisis o TaqMan.

Tomado de Costa, 2004.

Existen distintas variedades de sondas TaqMan de acuerdo al tipo de molécula aceptora. En las clásicas, TAMRA es el aceptor, el cual absorbe la energía emitida por el donador y emite la fluorescencia de fondo en una longitud de onda diferente. Una evolución a este tipo de sondas son las llamadas TaqMan-MGB, las cuáles presentan NFQ como molécula aceptora. NFQ no emite fluorescencia de fondo permitiendo, así, una cuantificación más fiable. Además, estas sondas incorporan la molécula MGB que facilita la hibridación con el ADN problema, al mejorar la especificidad y estabilidad de la unión, lo cual permite usar sondas muy cortas, de hasta 14 nucleótidos.

El *software* de las plataformas de PCR a tiempo real que detectan la señal de las sondas genera una curva patrón gracias al uso de patrones cuantitativos. Dichos patrones se generan a partir de diluciones seriadas de muestras o plásmidos que contienen concentraciones conocidas del fragmento de ADN a amplificar (**Figura 2.7.**). La curva patrón relaciona la fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de producto amplificado, con el ciclo de la reacción en el que el ADN es detectado. La cuantificación se lleva a cabo interpolando en la curva patrón el ciclo en el que el ADN presente en la muestra comienza a ser detectable para llegar a un dato final de concentración de ADN viral [Kubista et al., 2006; Smith et al., 2007].



**Figura 2.7.-**Ejemplo de curva patrón generada a partir de cinco diluciones de patrones conocidos.

Adaptado de Kubista et al., 2006.

Una de las principales limitaciones de la cuantificación de la carga viral mediante PCR a tiempo real reside en el uso de plásmidos en ausencia de patrones internacionales de virus completo. Los plásmidos, a diferencia de los viriones, no se ven afectados por la extracción de ADN, proceso cuya eficacia se ve reducida en el caso de los poliomavirus, debido a que sus viriones son muy resistentes y a que su ADN presenta una conformación superenrollada [Imperiale, 2007; Laghi et al., 2004; Weil and Vinograd, 1963]. El tipo de muestra y las diferencias en los protocolos de extracción del ADN también contribuyen a que no haya un consenso [Bechert et al., 2010].

Por estas razones, los protocolos empleados en los distintos laboratorios son difícilmente comparables y presentan diferencias significativas en el límite de detección y en el rango de cuantificación y, por lo tanto, la cuantificación de ADN viral y, en concreto de poliomavirus, ha de ser tomada con cautela fuera de la comparación interna de un mismo laboratorio [Bechert et al., 2010].

## **2.5.2.-DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA NEFROPATÍA INTERSTICIAL**

### **2.5.2.1.-ANATOMÍA PATOLÓGICA**

La técnica de referencia (*gold standard*) en el diagnóstico de la NAPV es el estudio anatomopatológico de la biopsia renal [Drachenberg et al., 2006]. Se recomienda obtener dos biopsias del núcleo del riñón que contengan parénquima medular, para asegurarse de no cometer errores en la toma de la muestra, ya que la disposición de la NAPV es focal [Hirsch et al., 2005; Racusen et al., 1999].

Es fundamental diferenciar entre el rechazo del órgano trasplantado y la existencia de NAPV. Ambos procesos son clínicamente indistinguibles y un diagnóstico equivocado de rechazo con el consiguiente tratamiento inmunosupresor puede derivar en la pérdida del trasplante en más del 50% de los casos [Dall and Hariharan, 2008; Ramos et al., 2009].

La biopsia renal característica de un paciente con NAPV observada al microscopio convencional muestra cuerpos de inclusión de poliomavirus, en las células del epitelio tubular y/o del epitelio parietal glomerular, que, a menudo, se asocian con necrosis de dichas células epiteliales y daño tubular agudo [Hirsch et al., 2005; Nicleit and Mihatsch, 2006].

Estas alteraciones han de confirmarse por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos del BKPyV o con anticuerpos frente al antígeno T de SV40, el cual presenta una reacción cruzada con el BKPyV, o por hibridación in-situ [Hirsch et al., 2005; Vats et al., 2006].

#### **2.5.2.2.- CÉLULAS SEÑUELO. HAUFEN**

Aunque el diagnóstico de la NAPV requiere el estudio anatomopatológico de la biopsia renal, existen otras técnicas que ayudan en el cribado de los pacientes, las cuales también son rápidas y reproducibles y menos invasivas.

Una de las pruebas empleada es la detección de células señuelo con cuerpos de inclusión basofílicos intranucleares que se pueden ver con la tinción de Papanicolau [Drachenberg et al., 2001; Vats et al., 2006]. Las células señuelo aparecen entre 5 y 6 meses antes de que se diagnostique la NAPV y desaparecen poco después de que se haya solucionado la infección [Vats et al., 2006]. Las células señuelo tienen asociada una sensibilidad del 25 %, una especificidad del 84% y, mientras que el valor predictivo negativo es del 97% demostrando que un análisis negativo indica que no existe nefropatía viral, su valor predictivo positivo es sólo del 5% [Viscount et al., 2007].

Recientemente, se ha comenzado a usar la microscopía electrónica para detectar agregados tridimensionales de poliomavirus en la orina llamados *Haufen*. Esta técnica ha resultado ser sensible y específica de la NAPV. Presenta valores predictivos positivo y negativo del 97% y 100%, respectivamente [Singh et al., 2009].

#### **2.5.2.3.-PCR CONVENCIONAL Y CUANTITATIVA EN ORINA Y SANGRE**

La técnica de PCR tanto convencional como cuantitativa no presenta las limitaciones de la citología y es más adecuada para el cribado de la NAPV.

En general, la viruria debida al BKPyV es el primer signo de la replicación activa del virus, por lo que la monitorización de la presencia del BKPyV en orina es fundamental para la prevención y el

diagnóstico precoz de la NAPV [Brennan et al., 2005; Drachenberg et al., 2006]. La concentración del BKPyV en orina es mucho mayor que en sangre ( $>4-6$  órdenes de magnitud), así que es más probable de detectar sobre todo con métodos poco sensibles [Bechert et al., 2010; Vats et al., 2006].

La ausencia del BKPyV en orina prácticamente descarta la existencia de NAPV [Hirsch et al., 2006; Vats et al., 2006] y existe cierto consenso respecto a que cargas virales  $> 10^7$  copias/ml constituyen un factor de riesgo significativo para el desarrollo de NAPV [Hirsch et al., 2005; Vats et al., 2006]. De hecho, la detección mediante PCR en orina de  $> 10^7$  copias/ml del BKPyV presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92%, un valor predictivo negativo del 100% y positivo del 31% para la detección de la NAPV [Viscount et al., 2007].

Una vez tratada la NAPV, el BKPyV se mantiene más tiempo en orina que en sangre, por lo que la cuantificación de la viruria del BKPyV permite controlar los cambios en la replicación del virus [Bechert et al., 2010].

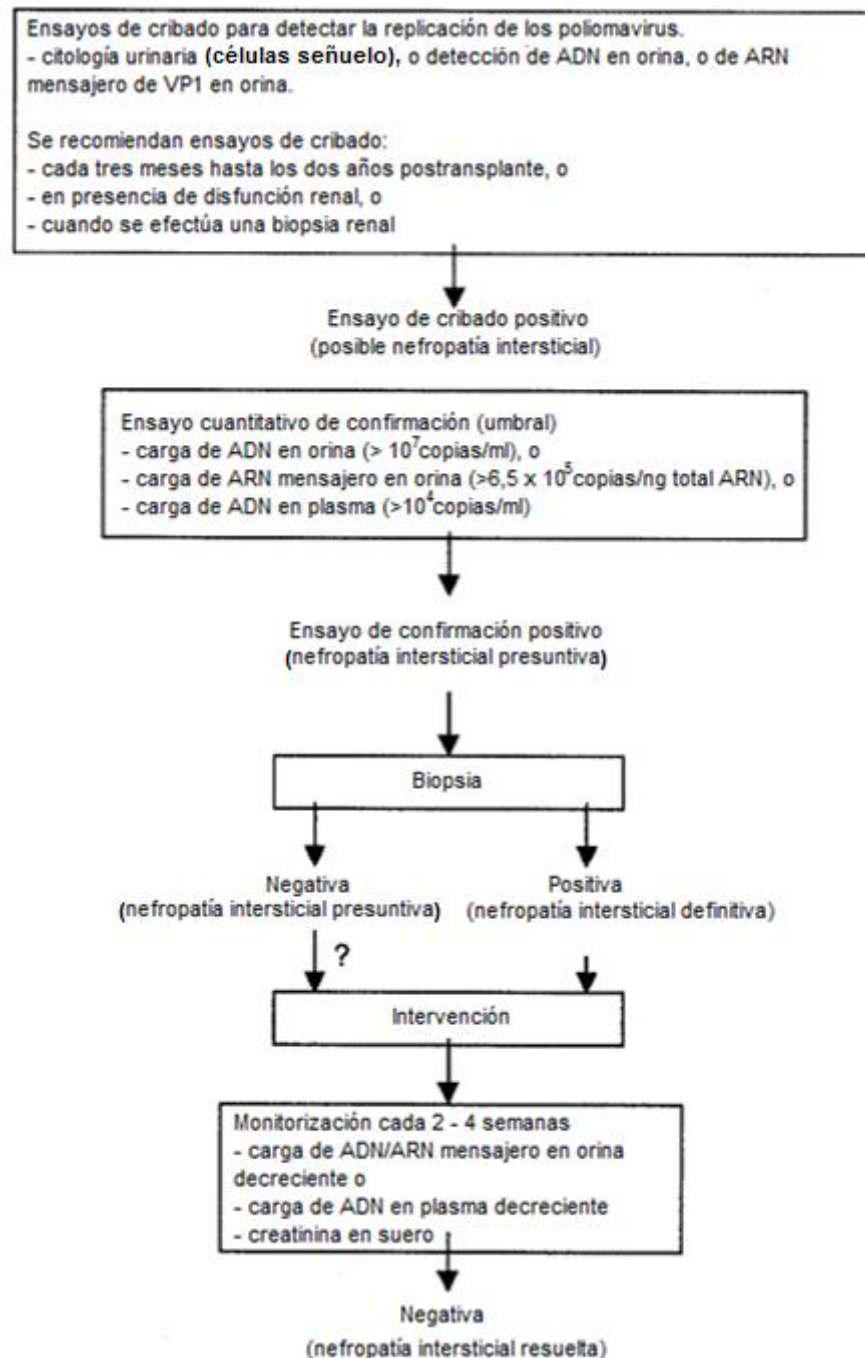
No sólo se puede cuantificar el ADN del BKPyV presente en orina sino la concentración del ARN mensajero de la proteína VP1, el cual puede predecir la aparición de la NAPV cuando alcanza valores  $>6,5 \times 10^5$  copias/ng totales de ARN. Dicha prueba presenta unos valores de especificidad y sensibilidad del 93,8% y del 93,9%, respectivamente [Ding et al., 2002; Hirsch et al., 2005; Vats et al., 2006].

La detección y cuantificación del BKPyV en sangre es la prueba de elección para confirmar el diagnóstico de la NAPV y para monitorizar a los pacientes [Hirsch et al., 2005; Vats et al., 2006]. Se considera que valores de viremia  $>10^4$  correlacionan significativamente con la aparición de NAPV [Hirsch et al., 2005; Ramos et al., 2002; Randhawa et al., 2004] y la detección de  $> 10^4$  copias/ml del BKPyV mediante PCR en sangre presenta unos valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo del 100%, 96%, 50% y 100% respectivamente [Viscount et al., 2007].

Asimismo, la presencia del BKPyV en sangre refleja la dinámica de la enfermedad: la conversión del plasma de negativo a positivo tras el trasplante renal, la persistencia del ADN del BKPyV en sangre durante el desarrollo de la NAPV y la desaparición del BKPyV del plasma tras la reducción del tratamiento inmunosupresor [Ramos et al., 2009; Vats et al., 2006].

#### ***2.5.2.4.-PANEL INTERNACIONAL PARA EL DIAGNÓSTICO Y MONITORIZACIÓN DE LOS PACIENTES***

Finalmente, se esquematizan las recomendaciones para el diagnóstico, y la monitorización de los pacientes con NAPV (**Figura 2.8.**), según un panel de consenso internacional [Hirsch et al., 2005]:



**Figura 2.8.-Cribado y monitorización de la replicación del poliomavirus BK.**

Tomado de Hirsch et al, 2005.

### 2.5.3.-DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA CISTITIS HEMORRÁGICA

En el diagnóstico de la cistitis hemorrágica, se emplea la detección de células señuelo en la orina. Sin embargo, dichas células no son específicas de la infección del BKPyV sino que pueden deberse a la infección del JCPyV o incluso, aunque más raramente, pueden provenir de la infección por el

adenovirus [Akiyama et al., 2001; Gorczynska et al., 2005; Mischitelli et al., 2010]. Dado que todos estos virus pueden ser agentes etiológicos de la cistitis hemorrágica, se suele llevar a cabo PCR del BKPyV en orina o suero [Bennett et al., 2012; Dropulic and Jones, 2008].

Generalmente, cuando la replicación del BKPyV es la causa de la cistitis hemorrágica, se observan cargas virales en orina muy altas, del orden de  $10^9$ - $10^{10}$  copias/ml o mayores, o incrementos en la viruria de más de 3 logaritmos [Bogdanovic et al., 2004; Wong et al., 2007]. Asimismo, cargas virales del BKPyV en sangre  $>10^4$  copias/ml también se consideran definitorias de la cistitis hemorrágica debida al BKPyV [Dropulic and Jones, 2008; Erard et al., 2005].

## **2.5.4.- DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE LA LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA**

### **2.5.4.1.-ANATOMÍA PATOLÓGICA**

La técnica de referencia en el diagnóstico de la LMP es el estudio anatomopatológico de la biopsia cerebral la cual presenta una sensibilidad entre el 64%-96% [Skolasky et al., 1999]. La biopsia cerebral de un paciente con LMP, generalmente, muestra pérdidas de oligodendrocitos, oligodendrocitos infectados con el núcleo alargado e hipercromático y proliferación de astrocitos “bizarros” multinucleados [Astrom et al., 1958; Berger, 2007].

Dicha prueba ha de ser confirmada mediante hibridación in situ o inmunohistoquímica con las que se detecta ADN del JCPyV o proteínas del mismo. La tinción con anticuerpos contra el antígeno T de SV40 es confirmatoria.

### **2.5.4.2.- PRUEBAS DE NEUROIMAGEN**

La biopsia cerebral tiene asociado un alto índice de morbilidad y mortalidad y las lesiones no son siempre accesibles [Koralnik et al., 1999]. Por todo ello, se emplean más las técnicas de detección por imagen. Destacan la tomografía computerizada y la resonancia magnética nuclear que tiene mayor rendimiento. La tomografía computerizada muestra lesiones hipodensas sin efecto de masa en la sustancia blanca y no captadoras de contraste. En la resonancia magnética, se evidencian lesiones hiperintensas en la secuencia T2 [Berger, 2007; Whiteman et al., 1993].

En el contexto clínico adecuado y una vez descartadas otras posibles causas de la afección neurológica como encefalopatía debida al VIH, linfoma del SNC y toxoplasmosis cerebral, las imágenes neuro-radiológicas sugestivas de LMP constituyen un diagnóstico probable del mismo [Boothpur and Brennan, 2010; Tan and Koralnik, 2010].

### **2.5.4.3-PCR EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO**

La detección de ADN del JCPyV en LCR mediante PCR presenta una sensibilidad y especificidad del 72%-92% y 92%-100%, respectivamente [Cinque et al., 1997]. Se considera que una PCR positiva para el JCPyV acompañada de los hallazgos clínicos y radiológicos pertinentes confirma el diagnóstico de la LMP, aún en ausencia de biopsia cerebral. De hecho, es extremadamente improbable amplificar JCPyV del LCR de un paciente que no padece LMP [Berger, 2007].

En algunos pacientes con LMP y SRI o en aquellos tratados con natalizumab, la concentración del JCPyV en LCR se encuentra en el límite de detección [Clifford et al., 2010; Marzocchetti et al., 2005]. En 15/28 pacientes con esclerosis múltiple tratados con natalizumab, se detectaron cargas virales del JCPyV < 500 copias/ml de LCR [Clifford et al., 2010].

Finalmente, hay una asociación inversamente proporcional entre la carga viral del JCPyV en el LCR y la supervivencia [Tan and Koralnik, 2010; Taoufik et al., 1998]. La presencia en el LCR de un paciente del JCPyV a una concentración de  $50\text{-}100 \times 10^3$  copias/ml o más está significativamente asociada con un pronóstico de mortalidad [Yiannoutsos et al., 1999].

### **2.5.5.-DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA ASOCIADA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

No existe un criterio diagnóstico establecido para este tipo de patología debido a lo infrecuente que es. Sin embargo, si se pueden establecer unas pautas que orienten acerca de un posible diagnóstico de la misma.

Un diagnóstico concluyente podría llevarse a cabo con demostración de la presencia del BKPyV en biopsia cerebral mediante hibridación in situ o inmunohistoquímica [Bratt et al., 1999; Hedquist et al., 1999]. Sin embargo, como la mayoría de los pacientes son enfermos VIH-positivos y trasplantados renales con afectación multiorgánica debida al BKPyV los siguientes hallazgos: (i) la detección de síntomas en el SNC, y, generalmente, también en el tracto urinario y en los ojos, (ii) PCR en LCR o tejido cerebral positiva al BKPyV y (iii) PCR o serología negativa a otros patógenos como JCPyV, herpes simple, CMV, etc., apoyaría un diagnóstico de infección neurológica debida al BKPyV [Lopes da Silva, 2011b].

## **2.6.-TRATAMIENTO DE LAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN POR LOS POLIOMAVIRUS HUMANOS BK Y JC**

### **2.6.1.-TRATAMIENTO DE LA NEFROPATÍA INTERSTICIAL**

No existe un tratamiento antiviral específico que sea efectivo para la NAPV. Generalmente, la intervención inicial consiste en reducir el tratamiento inmunosupresor para permitir al SI del paciente recuperar el control sobre la infección [Hirsch et al., 2006; Ramos et al., 2009; Trofe et al., 2006]. Sin embargo, la inmunosupresión deja al paciente desprotegido y existe riesgo de rechazo del trasplante, el cual varía mucho en los distintos estudios llevados a cabo (<10%->80%) [Hirsch et al., 2005]. En cualquier caso, no existen estudios aleatorios controlados que comparen los diferentes protocolos de reducción de la inmunosupresión.

El uso combinado de la reducción en la inmunosupresión junto con dosis bajas del antiviral cidofovir, un análogo de nucleósidos, parece ser efectivo [Kuypers et al., 2005; Trofe et al., 2006]. Sin embargo, a dosis altas, el cidofovir es nefrotóxico para los trasplantados renales [Hirsch et al., 2005]. Otro fármaco que parece ser relativamente efectivo es la leflunomida, una droga inmunosupresora [Faguer et al., 2007; Trofe et al., 2006]. Finalmente, las inmunoglobulinas intravenosas y las quinolonas han sido evaluadas en ensayos clínicos [Rinaldo and Hirsch, 2007; Sener et al., 2006; Trofe et al., 2006]. La conclusión general es que se necesitan estudios sistemáticos adicionales para valorar la eficacia de todos estos tratamientos.

Cuando el deterioro renal es severo, la nefrectomía resulta inevitable, eliminándose, así, la fuente de replicación viral con lo que es posible realizar un nuevo trasplante [Hirsch et al., 2005; Ramos et al., 2004].

### **2.6.2.-TRATAMIENTO DE LA CISTITIS HEMORRÁGICA**

La cistitis hemorrágica se trata con cuidados paliativos que incluyen tratamiento del dolor, hiperhidratación, diuresis forzada e irrigación de la vejiga [Dropulic and Jones, 2008].

El cidofovir y las fluoroquinolonas parecen ser bastante eficaces en el tratamiento de esta patología [Ganguly et al., 2010; Leung et al., 2005a].



### **2.6.3.-TRATAMIENTO DE LA LEUCOENCEFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA**

No existe un fármaco antiviral que sea eficaz en el tratamiento de la LMP. Además, en los escasos estudios llevados a cabo para evaluar tratamientos con citosina arabinosida, con cidofovir o con interferón- $\alpha$  (INF-  $\alpha$ ) se ha visto que dichos tratamientos no son eficaces [De Luca et al., 2008; Geschwind et al., 2001; Hall et al., 1998].

En los pacientes VIH-positivos, el tratamiento con la TAAA ha mejorado la supervivencia de los pacientes con LMP en torno a un año tras la aparición de los síntomas clínicos [Berger, 2007; Clifford et al., 1999; De Luca et al., 2000].

En los VIH-negativos y receptores de un trasplante, es necesario disminuir o eliminar la inmunosupresión. Por su parte, en los pacientes con LMP y SRI, se pueden usar esteroides dado que la LMP está asociada a inflamación [Tan and Korolnik, 2010]. En los pacientes tratados con natalizumab, no sólo es importante la interrupción del tratamiento con dicho fármaco sino que se deben eliminar el anticuerpo del cuerpo del paciente lo más rápidamente posible [Berger, 2010].

### **2.6.4.-TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN NEUROLÓGICA ASOCIADA AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

Dado el escaso número de casos publicados de este tipo de patología, es difícil concluir nada acerca del tratamiento más indicado.

En los pacientes VIH-positivos, la meningitis asociada a la infección por el BKPyV parece mejorar al ser tratada con reconstitución inmune y TAAA [Kinnaird and Anstead, 2010; Vidal et al., 2007].

## **2.7.- POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

El virus BK fue el primer poliomavirus humano descrito, el cual fue identificado por Sylvia Gardner en el año 1970. Gardner aisló partículas virales de una muestra de orina perteneciente a una paciente sudanesa cuyas iniciales eran B.K. y que había desarrollado estenosis uretral a los 3 meses de recibir un trasplante renal [Gardner et al., 1971].

El BKPyV, como todos aquellos virus pertenecientes a la familia *Polyomaviridae*, es un virus de ADN de doble cadena, circular, pequeño y desnudo. La cápsida icosaédrica del BKPyV tiene un diámetro de 40,5-44 nm y está compuesta por las proteínas VP1, VP2 y VP3. En su interior, contiene una molécula de ADN circular y de doble cadena de 5,3 pares de kilobases la cual forma un complejo con las histonas celulares H2A, H2B, H3 y H4 [Eash et al., 2006; Imperiale, 2007]. El

genoma del BKPyV tiene un 75% y un 69% de identidad de secuencia con los genomas del JCPyV y del SV40, respectivamente [Cubitt, 2006].

### 2.7.1.- ESTRUCTURA DEL GENOMA

El genoma del virus BK se puede dividir en tres dominios funcionales:

- a) La región temprana que codifica las proteínas reguladoras y entre ellas los antígenos T y t. Además, el BKPyV presenta la peculiaridad de codificar una tercera proteína de 17 o 20kDa denominada antígeno truncado el cuál se genera por un proceso alternativo de “corte y empalme”. Comparte los 133 primeros aminoácidos del extremo N-terminal con el antígeno T y, posee, además, tres aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal los cuáles se traducen a partir de un marco de lectura alternativo [Abend et al., 2009b].
- b) La región tardía que contiene la información genética de las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 y de la agnoproteína. A partir de la región tardía del BKPyV, se generan microARNs que regulan la expresión de los ARN mensajeros tempranos, al final del ciclo de replicación [Moens, 2009; White et al., 2009].
- c) La región de control no codificante o región reguladora que incluye el ORI bidireccional y secuencias implicadas en la regulación de la transcripción de los genes tempranos y tardíos.

#### 2.7.1.1.-LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE LA CÁPSIDA VP1, SUBTIPOS

##### 2.7.1.1.1.-Funciones de la proteína VP1

VP1 es la proteína mayoritaria de la cápsida del virus BK y constituye aproximadamente el 70%-80 % de la masa total de la partícula viral. En total, la cápsida del virus BK contiene 360 moléculas de VP1 organizadas en 72 pentámeros que se disponen en el exterior mientras que las proteínas VP2 y VP3 se encuentran en el interior de la misma [Imperiale, 2007; Tsai and Qian, 2010].

La principal respuesta inmune frente al BKPyV y otros poliomavirus va dirigida contra VP1, tal y como se deduce de ensayos que emplean como antígenos moléculas intactas del virus, como el enzimoimmunoanálisis o el ensayo de inhibición de la hemaglutinación [Rekvig et al., 2006]. Dicho ensayo se basa en la capacidad de VP1 de producir hemaglutinación de los glóbulos rojos [Bolen and Consigli, 1979].

Asimismo, VP1 está directamente implicada en la interacción con el receptor celular [Neu et al., 2009; Sapp and Day, 2009]. No se conoce la naturaleza exacta de dicho receptor pero se sabe que VP1 se une a un ácido siálico  $\alpha 2,3$  presente en una N-glicoproteína [Dugan et al., 2005] o en los gangliósidos GT1b y GD1b [Low et al., 2006; Sinibaldi et al., 1990].

Las estructuras cristalográficas del monómero de VP1 del poliomavirus SV40 y del poliomavirus de ratón en interacción con el receptor celular han podido ser resueltas [Liddington et al., 1991; Stehle and Harrison, 1996; Stehle and Harrison, 1997; Stehle et al., 1994]. Se ha visto que el monómero de VP1 está compuesto de varias láminas  $\beta$  que componen un barril  $\beta$  del que sobresalen los bucles externos AB, BC, CD, DE, EF, GH, and HI. La interacción con el receptor celular parece que se lleva a cabo a través del surco existente entre los bucles BC1 y BC2. [Stehle and Harrison, 1996; Stehle and Harrison, 1997; Stehle et al., 1994].

#### ***2.7.1.1.2.-Subtipos del poliomavirus BK y cambios aminoacídicos en VP1, implicación clínica***

Los aminoácidos 61-83 (nucleótidos 1744-1812 en la cepa Dunlop) del bucle BC de VP1 componen la llamada región de subtipado. El análisis de los diferentes polimorfismos de la región de subtipado se emplea en la clasificación del virus BK en los diferentes subtipos del I al IV [Jin et al., 1993]. Sin embargo, la subsiguiente clasificación de los subtipos del BKPyV que incluía subgrupos dentro del subtipo I (Ia, Ib y Ic) [Stoner et al., 2002; Takasaka et al., 2004] y del subtipo IV (IVa, IVb y IVc) [Ikegaya et al., 2006; Nishimoto et al., 2007] exige el análisis del genoma completo o al menos del antígeno T o la proteína VP1 completas [Sharma et al., 2006].

El subtipo I es el más común y se ha detectado en todo el mundo. El subtipo IV es el siguiente más frecuente y, finalmente, los subtipos II y III se han detectado muy raramente [Baksh et al., 2001; Carr et al., 2006; Ikegaya et al., 2006; Jin et al., 1995; Krumbholz et al., 2006; Takasaka et al., 2004; Yogo et al., 2007; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2007a].

Aunque las diferencias en la distribución de los distintos subtipos se deban, principalmente, a la diferente transmisibilidad de los mismos, las diferencias en la capacidad replicativa que presentan podrían influenciar su distribución. De hecho, la secuencia de aminoácidos de VP1 parece condicionar su capacidad de propagarse como se ha puesto de manifiesto en diversos estudios con cultivos celulares. Las cepas del subtipo I crecen más eficientemente que las cepas del subtipo IV en células epiteliales renales [Nukuzuma et al., 2006]. Por su parte, las cepas de BKPyV del subtipo III presentan una capacidad replicativa inferior a la del resto de subtipos cuando se analiza su crecimiento en células Vero [Tremolada et al., 2010c]. En otro estudio, se generaron 17 mutantes del virus BK, cada uno de los cuáles contenía mutaciones puntuales en aminoácidos cargados de los bucles BC, DE y HI, con los que posteriormente se infectaron células Vero. Se vio que algunos de estos mutantes no eran capaces de empaquetar su genoma, de ensamblar la cápsida o de unirse a la célula hospedadora [Dugan et al., 2007].

Por lo tanto, parece que la secuencia de aminoácidos de VP1 puede alterar las capacidades patogénicas del virus y es probable que, también, condicione el tropismo del mismo. Dado que la proteína VP1 participa en la interacción con el receptor celular, es lógico pensar que cambios en la

misma puedan alterar el rango de tipos celulares susceptibles de ser infectados, la afinidad por los receptores celulares o favorecer una evasión del SI [Moens and Van Ghelue, 2005].

Por todo ello, se han llevado a cabo estudios valorando la distribución de los subtipos del BKPyV en distintos grupos de pacientes inmunodeprimidos con o sin patología asociada a la infección por el virus BK. Se han evaluado cepas del BKPyV detectadas en sangre, orina y biopsias renales de trasplantados renales con o sin nefropatía intersticial [Baksh et al., 2001; Boldorini et al., 2009b; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010b] y en orina de trasplantados de médula ósea con o sin cistitis hemorrágica [Carr et al., 2006; Ikegaya et al., 2006]. En ningún caso, ha podido asociarse un subtipo específico del virus BK con la aparición de patología.

Asimismo, la implicación clínica de los cambios aminoacídicos en los bucles externos de VP1, principalmente en el bucle BC, se analizó en cepas del virus BK detectadas en sangre, orina y biopsias renales de trasplantados renales con o sin nefropatía [Boldorini et al., 2009b; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010b]. Al igual que con los subtipos, no parece que exista un patrón de mutaciones que determine que algunas cepas del BKPyV sean más patogénicas que otras. Sí se observó, sin embargo, una mayor frecuencia de cambios aminoacídicos, en el caso de los trasplantados renales con nefropatía respecto a los que no la padecían, indicando una mayor inestabilidad genómica del virus BK en dichos pacientes [Boldorini et al., 2009b].

Randhawa y colaboradores afirmaron detectar zonas “calientes” con una mayor frecuencia de mutaciones en la secuencia de la región de subtipado del BKPyV obtenida a partir de biopsias renales de pacientes con nefropatía. Asimismo, se observó que dicha inestabilidad genómica llevaba a que en diversas muestras de seguimiento de un mismo paciente se detectara un cambio del subtipo del BKPyV del I al IV [Randhawa et al., 2002].

Respecto a los pacientes con patología neurológica asociada a la infección por el virus BK, sólo hay datos de los nucleótidos 1657 al 2019 de un único paciente con lo que no es posible llegar a ninguna conclusión [Stoner et al., 2002].

Por otra parte, la proteína VP1 del virus JC la cual presenta una identidad aminoacídica del 78% con la proteína VP1 del virus BK se ha estudiado ampliamente [Johnson, 2010]. Se ha visto que el tropismo del virus JC es muy estrecho y que, por ejemplo, es incapaz de infectar células HeLa. Sin embargo, se ha visto expresión del virus JC en células HeLa transfectadas con el ADN desnudo de dicho virus [Schweighardt and Atwood, 2001].

En estudios más recientes, se ha observado que la secuencia de la proteína VP1 del JCPyV obtenida a partir del LCR o de tejido cerebral de pacientes con LMP presentan cambios aminoacídicos en los bucles externos de la proteína VP1. En concreto, la frecuencia de las sustituciones 55, 60 y 66 en el bucle BC, 123 en el bucle DE y 265, 267 y 269 en el bucle HI es

mayor que si se debiera al azar [Sunyaev et al., 2009; Zheng et al., 2005a]. Dichos cambios se atribuyen a la evolución adaptativa del virus y no están presentes en la orina de individuos inmunocompetentes [Sunyaev et al., 2009; Zheng et al., 2005b]. Además, se han detectado secuencias de VP1 idénticas en el LCR y en el plasma pareado de pacientes con LMP pero no así en la orina de los mismos pacientes [Gorelik et al., 2011].

De hecho, Sunyaev y colaboradores han profundizado más en el alcance biológico de dichas sustituciones aminoacídicas produciendo, para ello, PSV (partículas semejantes a virus), es decir, moléculas artificiales que se generan al expresar proteínas purificadas y recombinantes de VP1 en, por ejemplo, *Escherichia coli* o en células de insecto infectadas con baculovirus. Se vio que los PSVs generados con proteínas VP1 que contenían las mutaciones observadas en los pacientes con LMP presentaban una capacidad de hemaglutinación reducida en comparación con las VPLs generadas con proteínas VP1 sin mutar [Sunyaev et al., 2009].

Asimismo, Gorelik y colegas vieron de forma directa que los PSVs con dichas mutaciones presentaban una especificidad diferente por los gangliósidos de los receptores celulares. Esta diferente especificidad se traducía en una reducción en la unión del virus al ácido siálico de los receptores celulares presentes en las células periféricas y, probablemente, en un aumento de su patogenicidad. Se mantenía, sin embargo, el reconocimiento del ácido siálico perteneciente a las células del cerebro [Gorelik et al., 2011].

Por otra parte, también se ha asociado la presencia de las mutaciones 74,75, 117 y 128 en los bucles externos del VP1 detectados en LCR y muestras de cerebro de pacientes con LMP con una disminución en la capacidad replicativa y en la virulencia de las cepas del JCPyV que las poseen. Los pacientes en los cuáles se han detectado dichas mutaciones presentan un mejor pronóstico [Delbue et al., 2009].

### **2.7.1.2.-LA REGIÓN REGULADORA Y SUS REORGANIZACIONES**

La región reguladora del BKPyV es la región comprendida entre el codón de inicio del antígeno T y el comienzo del gen que codifica la agnoproteína y comprende 300-500 pares de bases [Eash et al., 2006]. Está compuesta por: (i) el denominado denominado bloque O en el que se encuentra el ORI y (ii) la región de control transcripcional (TCR) que, como su propia nombre indica, está implicada en la regulación de la transcripción del virus mediante la unión a la misma de diversos factores celulares [White et al., 2009].

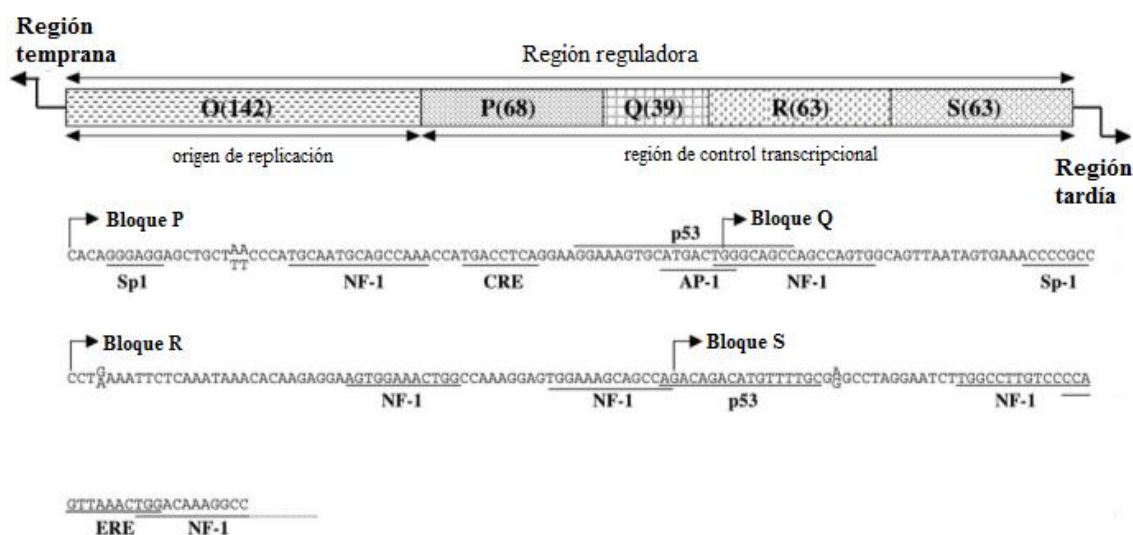
### 2.7.1.2.1.-Bloque O

El bloque O contiene secuencias muy conservadas. En esta región, se encuentra el ORI, la caja TATA del promotor temprano, el sitio de unión al antígeno T y algunos sitios de unión a factores de transcripción [Moens et al., 1995; White et al., 2009].

Entre ellos, existen sitios de unión a C/EBP $\beta$  y NF $\kappa$ B los cuales son susceptibles de ser regulados por citoquinas que activan la transcripción de los genes tempranos [Gorrill and Khalili, 2005]. Como en el caso del JCPyV, la proteína Tat del VIH, también, parece ser un potente transactivador de la transcripción de los genes tempranos del BKPyV a través del sitio de unión a NF $\kappa$ B y el llamado elemento del virus BK sensible a transactivación [Gorrill et al., 2006]. Este tipo de activación se ha descrito en algunos pacientes VIH-positivos y con nefropatía [Crum-Cianflone et al., 2007].

### 2.7.1.2.2.-Región de control transcripcional

La región de control transcripcional del BKPyV que se toma como referencia es la de la cepa WW, la cual se denomina arquetípica, como en el caso del JCPyV. Se puede dividir de forma arbitraria en cuatro bloques o elementos repetitivos: P (68 pares de bases), Q (39 pares de bases), R (63 pares de bases) y S (63 pares de bases) [Markowitz and Dynan, 1988; Moens et al., 1995] (**Figura 2.9.**).



**Figura 2.9.-** Representación esquemática de la región reguladora arquetípica del poliomavirus BK.

Tomado de Moens and Van Ghelue, 2005.

Esta región contiene sitios de unión a varios factores de transcripción, como NF-1 y Sp-1, que parecen ser necesarios para una eficiente transcripción de los genes tempranos. Sin embargo, la presencia de múltiples sitios de unión a factores de transcripción distintos hace muy difícil sacar conclusiones respecto a la influencia de cada uno de ellos por separado [White et al., 2009].

El bloque S contiene la secuencia líder de la transcripción de los genes tardíos y tiende a ser una secuencia conservada [Moens et al., 1995]. Moens y colaboradores han identificado sitios de unión a elementos de respuesta a glucocorticoides y a progesterona, en dicho bloque S, y han observado que la presencia de hormonas esteroideas como la progesterona y los estrógenos estimulan la transcripción de los genes tardíos y la replicación del BKPyV [Moens et al., 1994]. En un estudio prospectivo con trasplantados renales en terapia antirechazo con corticosteroides, se ha visto que dicho tratamiento está asociado con la replicación del BKPyV y la aparición de nefropatía [Hirsch et al., 2002].

#### ***2.7.1.2.3.-Reorganizaciones de la región reguladora, implicación clínica***

En general, la región reguladora del BKPyV es altamente variable con respecto al resto de zonas del genoma que son muy conservadas y se han detectado formas portadoras de mutaciones puntuales así como variantes reorganizadas. En concreto, la región reguladora del BKPyV se caracteriza por presentar el mayor grado de variación entre cepas de los poliomavirus de primates [White et al., 2009].

Las regiones reguladoras reorganizadas presentan duplicaciones y/o deleciones completas o de una parte de uno o varios de los bloques que conforman la región reguladora. En general, dichos cambios ocurren en cualquiera de los bloques aunque se ha observado una tendencia a mantener los bloques P y S, subrayando la importancia de dichas regiones [Moens and Van Ghelue, 2005; White et al., 2009]. También se ha observado que las deleciones totales o parciales suelen tener lugar en el bloque R [Cubitt, 2006]. El bloque O no suele sufrir ningún tipo de reorganización y presenta un alto grado de conservación [White et al., 2009].

Un caso extremo es el de la variante Dunlop, extensamente empleada como referencia al estudiar el BKPyV cuya conformación es OPPPS. Dicha cepa se aisló por primera vez de la sangre periférica de un individuo inmunocompetente [Seif et al., 1979]. Las uniones entre bloques P presentes en dicha cepa crean nuevos sitios de unión a AP1 que activan la transcripción de los genes tempranos [Moens et al., 1995].

Aunque el mecanismo exacto no se conoce, se cree que las reorganizaciones de la región reguladora se generan por recombinación entre regiones no homólogas de las dos hebras de ADN recién sintetizadas al replicar el virus [Cubitt, 2006]. El virus latente apenas replica o no replica en absoluto y, durante la reactivación, es cuando aumenta su actividad replicativa y con ella, la probabilidad de generar reorganizaciones en la región reguladora.

La región reguladora arquetípica está presente en cepas que han sido detectadas en la orina de individuos inmunocompetentes e inmunodeprimidos [Bhattacharjee and Chakraborty, 2004; Chang

et al., 1996a; Egli et al., 2009; Flaegstad et al., 1991; Markowitz et al., 1991; Rubinstein and Harley, 1989] y, por lo tanto, se cree que es la forma transmisible o infecciosa del virus. Estas cepas replican mal en cultivo celular y se ha visto que los sucesivos pases provocan la sustitución de dichas cepas por variantes cuya región reguladora es reorganizada [Rubinstein et al., 1991; Sundsfjord et al., 1990].

De todo lo anterior, se puede inferir que mientras que la cepa arquetípica originariamente infectaría al hospedador, la reactivación del virus ocasionaría la generación de variantes reorganizadas. Dichas reorganizaciones podrían alterar posibles sitios de unión a factores de transcripción dado que las duplicaciones o deleciones de los bloques producen creación o eliminación de algunos de ellos. Se cree que, como consecuencia, el tropismo celular y la capacidad de infectar células podrían verse afectados [Moens and Van Ghelue, 2005].

En efecto, las variantes reorganizadas se han detectado, frecuentemente, en asociación con enfermedad y hay referencias de formas reorganizadas en biopsias renales de pacientes con nefropatía intersticial [Boldorini et al., 2009a; Boldorini et al., 2005b; Olsen et al., 2006; Randhawa et al., 2003] y en orina de pacientes con cistitis hemorrágica [Carr et al., 2006; Priftakis et al., 2001]. Sin embargo, dichas reorganizaciones no parecen ser una condición ni necesaria ni suficiente para el desarrollo de estas patologías, puesto que no todos los pacientes presentan cepas del BKPyV con reorganizaciones, sino que la variante arquetípica parece ser la más común. Además, también pudieron observarse reorganizaciones en formas identificadas en pacientes que no desarrollaron la enfermedad [Boldorini et al., 2005b; Carr et al., 2006; Olsen et al., 2006].

Por otra parte, Gosert y colaboradores, en un esclarecedor estudio, vieron que las variantes reorganizadas emergían y sustituían a las arquetípicas que, previamente, habían predominado en el plasma de los pacientes con nefropatía [Gosert et al., 2008]. En estudios previos, ya se había sugerido que las reorganizaciones podían tener lugar en la sangre, en concreto en los linfocitos de la sangre periférica donde se habían detectado formas arquetípicas así como reorganizadas [Chatterjee et al., 2000; Degener et al., 1999].

Volviendo al estudio de Gosert y colaboradores, la aparición de las formas reorganizadas correlacionaba con una mayor carga viral de BKPyV en plasma. Se comprobó, asimismo, *in vitro*, que las variantes reorganizadas detectadas en biopsias de algunos de estos pacientes presentaban un aumento en la replicación, en la expresión de los genes tempranos y en la capacidad citopática respecto a las cepas arquetípicas [Gosert et al., 2008].

Además, Broekema y colaboradores demostraron al analizar todas las partes del genoma por separado (regiones temprana y tardía y región reguladora) que el mayor determinante genético de replicación en células epiteliales del túbulo proximal del riñón, (hospedador natural del BKPyV) es la región reguladora [Broekema et al., 2010].



Como se ha comentado con respecto a la patogenia de la infección neurológica debida al BKPyV, sólo se conoce la secuencia la región reguladora del virus obtenida a partir de diversas muestras de dos pacientes, con lo que resulta difícil llegar a alguna conclusión. En ambos casos, se detectaron formas reorganizadas (PQSPQS y PQRSPQRS) en LCR y cerebro y formas arquetípicas en orina [Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002].

Sin embargo, sí existen datos referentes a la asociación entre la región reguladora del poliomavirus JCPyV y el neurotropismo. Como se ha dicho anteriormente, JCPyV también presenta una forma arquetípica transmisible que es la única que se detecta en el riñón y en la orina de individuos sanos [White and Khalili, 2011; Yogo et al., 1990] mientras que las variantes reorganizadas se han asociado repetidamente con el desarrollo de LMP [Vaz et al., 2000; White and Khalili, 2011]. Asimismo, el análisis *in vitro* de las regiones reguladoras reorganizadas del JCPyV detectadas en el LCR de pacientes con LMP mostró que las variantes portadoras de dichas regiones reguladoras reorganizadas poseían una capacidad replicativa y una expresión de los genes tempranos aumentadas respecto a la variante arquetípica [Gosert et al., 2010].

El neurotropismo y el aumento en la transcripción asociados a las variantes del JCPyV con región reguladora reorganizada pueden ser explicadas, en parte, por la presencia en las mismas de una duplicación en tándem de una parte de la región de control transcripcional de 98 pares de bases. La cepa reorganizada original que contiene este tipo de duplicación es la llamada cepa prototípica, Mad-1. Los elementos de 98 pares de bases duplicados son activadores de la transcripción y, al interaccionar con diversos factores celulares, determinan, en parte, el tropismo del JCPyV por las células gliales y el hecho de que la replicación del virus esté restringida a astrocitos y oligodendrocitos [White et al., 2009].

Por ejemplo, el factor de la transcripción específico de las células gliales Tst-1 promueve la transcripción del JCPyV y el tropismo por dichas células [Wegner et al., 1993]. Asimismo, NF-1X se sobreexpresa en cerebro y en otras células susceptibles de infección por JC y afecta a la transcripción de los genes tempranos y tardíos del mismo [Shinohara et al., 1997; Sumner et al., 1996].

Por otra parte, es conocida la transactivación del JCPyV vía proteína Tat en los pacientes VIH-positivos con LMP. Dicha proteína junto con el factor celular de transcripción Pura forman el complejo Pura/Tat los cuáles se unen a un elemento denominado GRS/upTAR activando la transcripción y la replicación del JCPyV [Daniel et al., 2001; Krachmarov et al., 1996].

Asimismo, se ha visto que existe una regulación positiva de la proteína del factor de crecimiento (Egr-1) en astrocitos en cultivo que se infectaron con el JCPyV y en oligodendrocitos y astrocitos provenientes de pacientes con LMP. Se sabe, además, que Egr-1 se une al citado elemento GRS

activando la transcripción tardía del JCPyV, por lo que se puede suponer que la inducción del Egr-1 pueda ser importante en la patogenia del LMP [Romagnoli et al., 2008].

## **2.8.-CICLO REPLICATIVO DEL POLIOMAVIRUS**

### **HUMANO BK**

#### **2.8.1.-UNIÓN A LOS RECEPTORES CELULARES**

Al infectar las células susceptibles, el poliomavirus humano BKPyV se une a receptores de la membrana plasmática de la célula hospedadora a través de la proteína VP1 (**Figura 2.10**). Gracias a la estructura cristalográfica del poliomavirus murino, con el que BKPyV guarda gran similitud, se sabe que el virus se une al receptor celular en la zona correspondiente al surco entre los bucles BC1 y BC2 de VP1. Además, el receptor interacciona con las cadenas laterales de los bucles BC y HI [Stehle and Harrison, 1996; Stehle and Harrison, 1997; Stehle et al., 1994].

No se conoce la naturaleza proteínica del receptor celular del BKPyV pero se sabe se une a un ácido siálico  $\alpha(2,3)$  bien presente en una N-glicoproteína [Dugan et al., 2005] o en los gangliósidos GT1b y GD1b [Low et al., 2006; Sinibaldi et al., 1990].

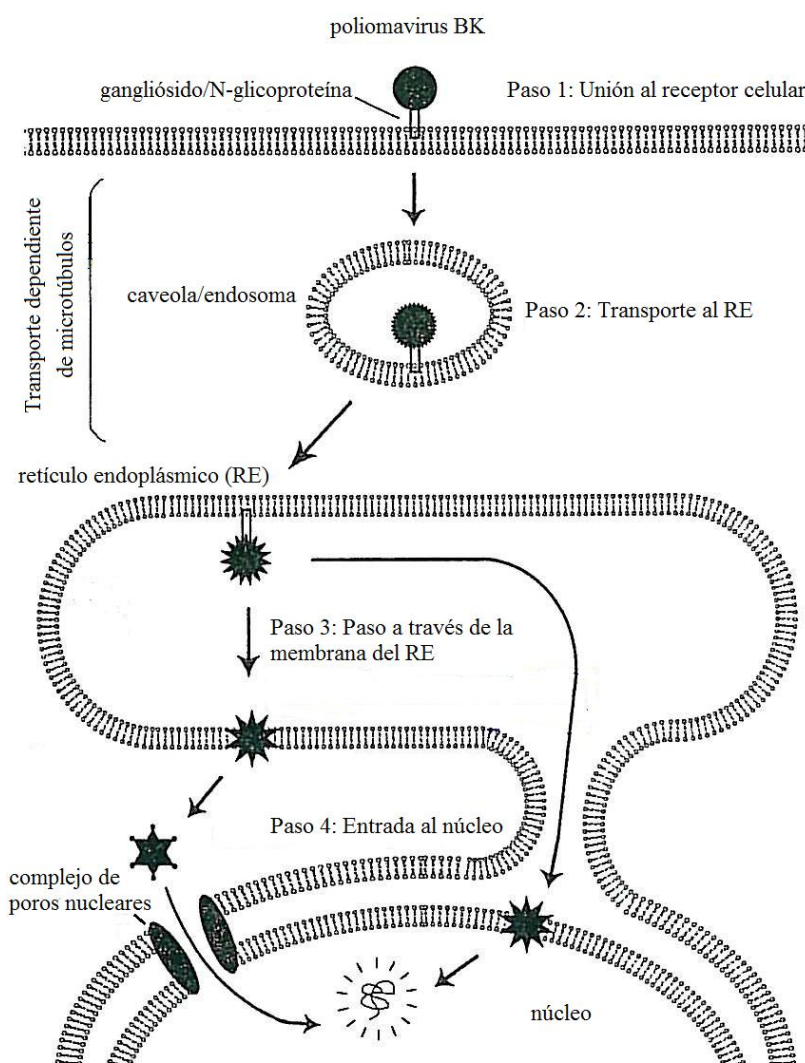
#### **2.8.2.-ENTRADA CELULAR, TRÁFICO INTRACELULAR Y LIBERACIÓN DEL GENOMA**

El BKPyV entra en la célula mediante endocitosis asociada a la formación de caveolas. Se ha visto que este proceso es relativamente lento, pudiendo requerir unas 4 horas para llegar a término. Una vez en el interior de la caveola, el proceso infeccioso requiere una etapa de acidificación [Eash et al., 2004] sugiriendo una conexión clave entre los sistemas caveolar y endosómico. Además, se sabe que es dependiente de una señal mediada por una tirosin-fosforilación [Dugan et al., 2006].

Se cree que una vez en el interior de la caveola el virus se desplaza mediante los microtúbulos polimerizados de la célula infectada [Eash and Atwood, 2005; Jiang et al., 2009b]. El virión alcanzaría el retículo endoplasmático (RE). [Low et al., 2006] y las caveolas que contienen el virión se fundirían con la membrana del mismo. Sin embargo, no se sabe con exactitud si lo hace vía el aparato de Golgi [Eash et al., 2004] o, sorteando este orgánulo [Moriyama et al., 2007].

En cualquier caso, el paso por el RE podría ser decisivo para que se lleven a cabo los cambios conformacionales que permiten al virus atravesar la membrana del RE para alcanzar el citosol [Tsai and Qian, 2010]. Una vez en el citosol, el proteosoma degradaría al virus provocándole alteraciones estructurales necesarias para la entrada en el núcleo [Jiang et al., 2009b; Tsai and Qian, 2010].

No se conoce la ruta del BKPyV hasta el núcleo pero podría tener lugar mediante el complejo de poros nucleares, como en el caso del SV40, o, directamente, sin pasar por el citosol dado que la membrana del retículo endoplásmico es continua con la membrana nuclear. Parece poco probable que el virión entero penetre en el núcleo y se cree que es el genoma viral desnudo el que es liberado en el interior del mismo [Tsai and Qian, 2010].



**Figura 2.10.** -Ruta de entrada del BKPyV en la célula infectada.

Adaptado de Tsai and Qian, 2010.

### 2.8.3.-TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN

Una vez que el genoma viral se ha liberado en el núcleo de la célula, tiene lugar la transcripción de los genes tempranos, la cual está regulada por el promotor temprano, mediante la ARN polimerasa II celular [Imperiale, 2007].

El transcrito primario generado sufre varias diversas alternativas de “corte y empalme” dando lugar a las tres proteínas tempranas o reguladoras diferentes: los antígenos T, t y el T truncado.

Las funciones reguladoras del antígeno T han de estar activas para que se produzca la replicación celular. El antígeno T produce la entrada de la célula en fase S al interactuar con la pRb y otros miembros de la familia del retinoblastoma como p107 y p130 y evitar la represión de la transcripción [Felsani et al., 2006; Harris et al., 1996]. Asimismo, el antígeno T se une a la proteína supresora de tumores p53 evitando la apoptosis celular [Imperiale, 2007]. El antígeno t, por su parte, bloquea la PP2A modulando las propiedades de crecimiento de la célula y maximizando la replicación viral [Yang et al., 1991].

Una vez que ha tenido lugar la síntesis de las proteínas reguladoras y se ha establecido las condiciones celulares adecuadas para la síntesis del ADN, acontece la replicación viral. El antígeno T se une al ORI formando un hexámero doble que provoca la hidrólisis del ATP, el desenrollamiento de la molécula de ADN viral debido a su función helicasa y el reclutamiento del complejo ADN polimerasa  $\alpha$ -primasa [Dornreiter et al., 1992; Simmons, 2000].

Posteriormente, el antígeno T recluta a las proteínas de replicación A y a la topoisomerasa I y comienza la síntesis del ADN. La replicación es bidireccional y es llevada a cabo por la ADN polimerasa  $\delta$  con su complejo accesorio, el antígeno de proliferación celular y el factor de replicación C. El antígeno T también participa en la elongación de las cadenas de ADN. La replicación acaba con la separación de las dos moléculas de ADN circular, la cual es mediada por la topoisomerasa II [Imperiale, 2007].

Al acabar la replicación del genoma, el antígeno T media la represión de la transcripción de los genes tempranos y estimula la transcripción de los genes tardíos y la expresión de las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 y de la agnoproteína. Asimismo, se generan microARNs y que son perfectamente complementarios al antígeno T reduciendo así la expresión del mismo [White et al., 2009].

#### **2.8.4.-ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES**

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 son transportadas desde el citoplasma, donde son producidas, al núcleo gracias a señales de localización nuclear. Se cree que la proteína VP1 es traslocada al núcleo independientemente de VP2 y VP3 [Eash et al., 2006].

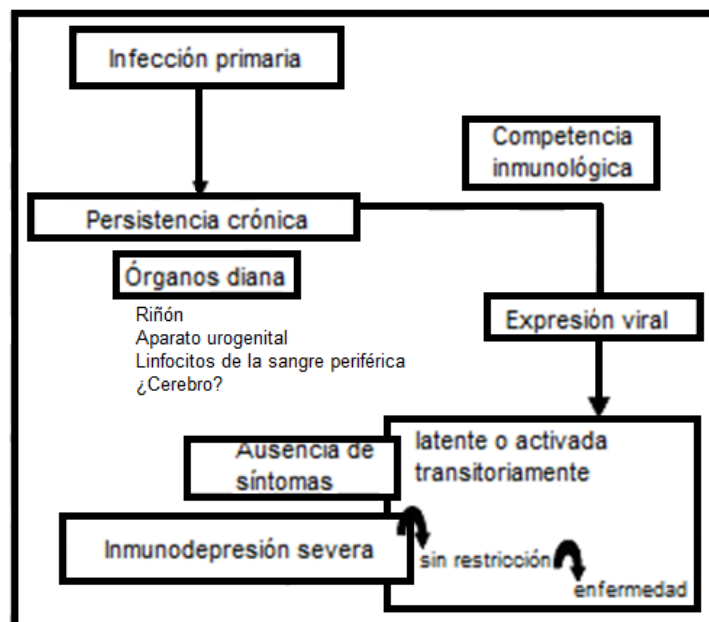
En el núcleo tiene lugar el ensamblaje de las proteínas de la cápsida que da lugar a los capsómeros. El extremo C' terminal de una molécula de VP1 se introduce en la siguiente molécula de VP1 para así dar lugar a los pentámeros de VP1 y, por extensión, a la cápsida icosaédrica formada por 72 de estos pentámeros [Stehle and Harrison, 1997]. En el centro de cada pentámero reside una molécula

de VP2 o de VP3. La molécula de ADN se empaqueta con las histonas H2A, H2B, H3 y H4, creando una estructura de mini-cromosoma que es casi indistinguible de la cromatina de la célula hospedadora [Eash et al., 2006].

No está claro si el virus para liberarse provoca la lisis celular, posiblemente junto con apoptosis [Norkin and Ouellette, 1976] o bien es capaz de salir de células intactas [Clayson et al., 1989].

## **2.9.-PATOGENIA DEL POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

La patogenia de la infección por el poliomavirus humano BKPv incluye las siguientes etapas (1) entrada del virus en el organismo, (2) multiplicación en el lugar de entrada, (3) transporte del virus a los órganos diana, (4) multiplicación en los órganos diana, (5) establecimiento de latencia en condiciones de inmunocompetencia, (5) reactivación y (6) patología en situaciones de inmunosupresión severa [Ahsan and Shah, 2006; Doerries, 2006] (**Figura 2.11**).



**Figura 2.11.-**Patogenia de la primoinfección y de la reactivación del poliomavirus BK.

Adaptado de Dorries, 2006.

### **2.9.1.- TRANSMISIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA**

La primoinfección tiene lugar en edades muy tempranas y el modo de transmisión no está aún bien definido. La hipótesis más aceptada es que la transmisión tiene lugar por la vía respiratoria ya que se ha conseguido aislar ADN del BKPv de aspirados nasofaríngeos y de amígdalas de niños con enfermedades respiratorias [Goudsmit et al., 1982; Sundsfjord et al., 1994]. También parece probable la transmisión oral-fecal ya que se ha detectado ADN del BKPv en heces de niños y en

aguas residuales urbanas [Bofill-Mas et al., 2000; Vanchiere et al., 2005] y la transmisión oral-urinaria debido a que el riñón es un conocido reservorio del BKPyV [Arthur et al., 1989; Randhawa et al., 2006]. La vía vertical o perinatal ha sido investigada con resultados controvertidos [Coleman et al., 1980; Pietropaolo et al., 1998b].

En un estudio reciente, sin embargo, se mostraron evidencias serológicas de la transmisión de la infección de la madre al recién nacido [Boldorini et al., 2011]. Finalmente, también se ha propuesto la transmisión vía trasplante de órganos [Andrews et al., 1988; Hirsch et al., 2002] y parece que el riesgo está asociado a que el donante sea seropositivo a anticuerpos anti-BKPyV y el receptor seronegativo [Andrews et al., 1988].

La primoinfección suele ser asintomática o estar asociada a síntomas respiratorios leves como se ha observado en estudios en los que se han demostrado seroconversión al BKPyV [Goudsmit et al., 1981; Goudsmit et al., 1982]. La primoinfección con el virus BK puede cursar con cistitis, y nefritis, generalmente en niños inmunodeprimidos [Ahsan and Shah, 2006; Hashida et al., 1976; Saitoh et al., 1993]. Muy raramente, se ha asociado con el desarrollo de encefalitis [Voltz et al., 1996].

La infección por el poliomavirus BK es común en todas partes del mundo excepto en poblaciones remotas de la India o en tribus aborígenes de Brasil, Paraguay y Malasia [Knowles, 2006]. Como se ha dicho anteriormente, la seroprevalencia global frente al BKPyV alcanza valores del 82%-94% en la población general [Carter et al., 2009; Egli et al., 2009; Kean et al., 2009; Kjaerheim et al., 2007] mientras que, en embarazadas, se obtuvieron valores del 84% [Boldorini et al., 2011].

Respecto a la dinámica de anticuerpos frente al BKPyV, los recién nacidos presentan anticuerpos maternos que se pierden durante los primeros meses de vida de manera que entre los 4-11 meses de edad sólo el 5% de los niños presentan anticuerpos frente al BKPyV. No es hasta el segundo año de vida que comienzan a aumentar de nuevo, alcanzando valores en torno al 90% a los 5-10 años de edad [Knowles et al., 2003; Stolt et al., 2003]. Durante la adolescencia sufren un ligero aumento y en edades adultas disminuyen gradualmente desde los 50-60 años, hasta adquirir valores del 70% a partir de los 70 años [Kean et al., 2009; Knowles et al., 2003].

## **2.9.2.- DISEMINACIÓN Y PERSISTENCIA**

No se conoce el mecanismo exacto por el cual el poliomavirus BK es transportado hasta los órganos diana. La presencia de ADN del BKPyV en los linfocitos de la sangre periférica y en el bazo [Chatterjee et al., 2000; Dorries et al., 1994; Pietropaolo et al., 2003] sugiere la diseminación hemática, bien pasiva o mediada por células blancas como medio de distribución del virus hasta los órganos diana [Jiang et al., 2009a]. El rango de tipos celulares susceptibles de infección depende de

los factores de transcripción y receptores específicos de cada uno de los mismos [Moens and Van Ghelue, 2005].

Una vez alcanzados los órganos diana, el BKPyV establece latencia si el hospedador es inmunocompetente. Entre los principales órganos diana en los que el BKPyV establece su latencia destacan los siguientes:

- a) En primer lugar, el tracto urogenital incluyendo los riñones, la cervix uterina, la próstata y la vejiga [Chesters et al., 1983; Heritage et al., 1981; Jiang et al., 2009a; Pietropaolo et al., 2003]. Empleando análisis por inmunotinción específica para el BKPyV se han identificado las células epiteliales del riñón, el uréter y la vejiga como los principales tipos celulares que sufren la infección persistente del BKPyV [Shinohara et al., 1993]. Por lo tanto, que el BKPyV tiene un marcado tropismo por el tracto urogenital.
- b) En segundo lugar, los linfocitos de la sangre periférica [Chatterjee et al., 2000; Dorries et al., 1994].
- c) Un sitio potencial de latencia es el tejido linfoide ya que el BKPyV se ha detectado en bazo y amígdalas [Goudsmit et al., 1982; Pietropaolo et al., 2003].
- d) Otros posibles sitios de latencia son el cerebro y el tejido óseo [De Mattei et al., 1995; Pietropaolo et al., 2003].

No está claro si el estado de latencia implica un nivel de replicación bajo o nulo aunque podría tener lugar de forma intermitente como evidencia la excreción periódica del virus en la orina en un 5%-7% de los individuos inmunocompetentes analizados [Egli et al., 2009; Husseiny et al., 2010].

### **2.9.3. –REACTIVACIÓN Y EXCRECIÓN URINARIA**

La reactivación del BKPyV puede tener lugar en diversos contextos que se resumen en los siguientes:

- a) En condiciones de inmunodepresión leve tales como embarazo, edad avanzada y diabetes en las que la reactivación está ligada a viruria asintomática [Bendiksen et al., 2000; Bhattacharjee and Chakraborty, 2004; Coleman et al., 1980; Markowitz et al., 1991; Zhong et al., 2007b].
- b) En el contexto de inmunodepresión severa, en el caso de trasplantados renales y de médula ósea pero también en trasplantados de otros órganos sólidos, pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso o con inmunodeficiencias primarias, enfermos VIH-positivos o sometidos a otro tipo de tratamientos inmunosupresores [Cabrejo et al., 2005; Chang et al., 1996a; Jin et al., 1995; Munoz et al., 2005; Sundsfjord et al., 1999]. La reactivación en estos individuos da lugar a una infección lítica que puede estar asociada a

viruria y viremia y que potencialmente puede desembocar en patología [Jiang et al., 2009a].

En pacientes inmunodeprimidos, se ha visto que los niveles de viruria correlacionan con el grado de inmunodepresión indicando que la replicación viral se debe más probablemente a la reactivación del virus que a una reinfección [Jiang et al., 2009a; Tsai et al., 1997]. En el caso de los enfermos VIH-positivos, se ha visto que dicha viruria es inversamente proporcional al número total de CD4 [Knowles et al., 1999; Marinelli et al., 2007].

Como se ha dicho anteriormente, la excreción urinaria del BKPyV es asintomática en personas inmunocompetentes. En niños menores de 10 años, la viruria del BKPyV presenta grandes variaciones entre estudios y oscila entre 4%-27% [Di Taranto et al., 1997; Jin et al., 1995; Knowles, 2006; Zhong et al., 2007b] mientras que los valores globales en los estudios con adultos no sobrepasan el 7% [Arthur et al., 1989; Bialasiewicz et al., 2009; Egli et al., 2009; Shah et al., 1997]. En el estudio de Zhong y colaboradores, en el grupo de 0-9 años, los valores son altos, en torno al 24%, para descender en el grupo de edad incluido entre los 10 y los 30 años y aumentar progresivamente en edades posteriores hasta los 80-89 años en los que la viruria alcanza valores del 40% [Zhong et al., 2007b].

Este aumento asociado a personas de edad avanzada está relacionado con el estado de inmunodepresión de dichos individuos, hecho que también influye en el caso de las embarazadas [Bendiksen et al., 2000; Coleman et al., 1980; Chang et al., 1996b; Jin et al., 1995; Markowitz et al., 1991; Tsai et al., 1997]. Los valores de viruria van aumentando con el progreso de embarazo y mientras que en el primer trimestre y principio del segundo hay datos de ausencia de excreción del BKPyV (semanas 3-14), en el final del segundo trimestre y en el tercer trimestre hay datos de excreción de entre 4%-24% (semanas 16-39) [Bendiksen et al., 2000; Tsai et al., 1997].

Con respecto a los trasplantados, el 10-60% de los receptores de un trasplante renal excretan el BKPyV en la orina [Anzivino et al., 2011; Drachenberg et al., 2007; Randhawa and Brennan, 2006; Saundh et al., 2010] y en el 55%, 32%, 26%, y 11% de los trasplantados de médula ósea, pulmón, corazón, e hígado, respectivamente [Amir et al., 2011; Azzi et al., 1994; Bedi et al., 1995; Dropulic and Jones, 2008; Munoz et al., 2005; Randhawa et al., 2005; Razonable et al., 2005; Vilchez and Kusne, 2006].

En los enfermos VIH-positivos, se ha observado viruria en el 15%-58% de los individuos estudiados [Ahsan and Shah, 2006; Knowles et al., 1999; Ledesma et al., 2011; Shah et al., 1997]. En los pocos estudios en los que se ha evaluado la presencia de ADN del BKPyV en orina de pacientes con lupus eritematoso, se han obtenido frecuencias del BKPyV en orina muy dispares, 16%-72% [Lu et al., 2009; Sundsfjord et al., 1999].



## **2.10.-RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR FRENTE AL POLIOMAVIRUS HUMANO BK**

### **2.10.1.-INMUNIDAD INTRÍNSECA**

La inmunidad intrínseca hace referencia a las respuestas celulares con propiedades antivirales que se expresan de forma constitutiva. Un ejemplo, son los cuerpos nucleares promielocíticos con los que el BKPyV interacciona, interfiriendo en su efecto antiviral, al causar la dispersión de dos de las proteínas principales que los componen, hDaxx y Sp100 [Jiang et al., 2011].

Existen datos de que los cambios estructurales en dichos cuerpos nucleares promielocíticos podrían tener un papel en la patogenia de diversas enfermedades desmielinizantes, como en el caso de la LMP. Mediante inmunohistoquímica, se ha detectado acumulación de progenie viral del JCPyV en cuerpos promielocíticos detectados en células gliales de pacientes con LMP [Shishido-Hara, 2010].

### **2.10.2.-INMUNIDAD INNATA**

No existe demasiada información relacionada con la respuesta inmune innata frente al BKPyV. Sin embargo, en un estudio, se identificó a un grupo de pacientes que antes de ser trasplantados contaban con un número reducido de células dendríticas y que, una vez trasplantados, presentaron un riesgo incrementado de desarrollar viremia [Babel et al., 2011]. Teniendo en cuenta que las células dendríticas son importantes para la presentación antigénica y para la activación de las células T, un descenso en las mismas significaría un defecto en la inmunidad que, como se ha visto, es el principal factor implicado en el desarrollo de la NAPV [Hirsch et al., 2005; Manitpisitkul et al., 2010].

Por otro lado, las defensinas humanas antimicrobianas y las citoquinas antivirales también parecen ser importantes a la hora de controlar la infección debida al BKPyV [Bennett et al., 2012]. La defensina  $\alpha$  5 humana interacciona con la partícula viral produciendo agregación de la misma y bloqueando su unión a las células del hospedador [Dugan et al., 2008]. Asimismo, el INF- $\gamma$  inhibe la transcripción viral [Abend et al., 2007].

No obstante, estudios con chips de ADN (*microarray*), en células del epitelio del túbulo proximal renal infectadas con el BKPyV, muestran que el virus no induce una respuesta inmune innata del tipo de las citoquinas por parte del hospedador [Abend et al., 2010]. Se cree, por tanto, que el BKPyV evade la respuesta innata del hospedador o también puede deberse al hecho de que el hospedador, al ser un trasplantado renal en tratamiento con altas dosis de inmunosupresores, esté inmunodeprimido [Bennett et al., 2012].

Uno de los posibles mecanismos de evasión del SI, es la generación de micro-ARNs que son complementarios de ARNs mensajeros presentes en la célula, provocando la degradación de los mismos [Seo et al., 2008]. Existen micro-ARNs complementarios del ligando inducido por estrés, ULBP3, el cual es reconocido por el receptor de las células asesinas naturales, NKG2D. De esta forma, los micro-ARNs colaboran en la evasión del reconocimiento inmune y en la destrucción de células asesinas naturales infectadas [Bauman et al., 2011].

### **2.10.3.-INMUNIDAD ADAPTATIVA**

La respuesta inmune adaptativa frente al BKPyV en el contexto de la NAPV, es un área activa de investigación. La inmunidad humoral no parece ser suficiente para restringir la infección debida al BKPyV y, en un estudio prospectivo, se vio que, aproximadamente, el 80% de los pacientes eran previamente positivos antes del trasplante renal y que incluso aquellos que eran seropositivos, posteriormente, desarrollaban viremia o NAPV [Hirsch et al., 2002].

En contraste a la respuesta humoral, la inmunidad ligada a células T específicas para el BKPyV sí parece controlar la respuesta viral [Bennett et al., 2012; Jiang et al., 2009a]. De hecho, en pacientes con NAPV, los niveles altos de linfocitos T citotóxicos anti-BKPyV y títulos bajos de anticuerpos frente a dicho virus están asociadas con cargas virales reducidas en sangre y orina; mientras que una respuesta débil de linfocitos T citotóxicos y niveles de anticuerpos altos correlacionan con cargas virales en sangre elevadas [Chen et al., 2006]. Además, los niveles bajos de células T anti-BKPyV productoras de INF- $\gamma$  están relacionados con progresión a NAPV, mientras que la reconstitución de dicha respuesta celular correlaciona con la resolución de la patología [Binggeli et al., 2007; Chen et al., 2006; Prosser et al., 2008].

Sin embargo, la respuesta de células T parece ser beneficiosa al comienzo de la infección pero al final de la misma produce un efecto inmunopatógeno. De hecho, se ha visto que la pérdida del trasplante puede estar asociada a acumulación de células T CD8+ específicas del BKPyV en el órgano trasplantado, como en el caso de JCPyV en la LMP-SRI [Babel et al., 2011; Vendrely et al., 2005].

No se conoce cuál es la respuesta inmune frente al BKPyV en las infecciones neurológicas asociadas al mismo pero sí se han estudiado las respuestas celulares y humorales frente al JCPyV en el contexto de la LMP. El resultado es similar a lo observado con el BKPyV en los casos de NAPV. La respuesta humoral no parece ser importante dado que los niveles de anticuerpos anti-JCPyV no cambian durante la progresión de la enfermedad ni son detectables en LCR [Jiang et al., 2009a]. Por otra parte, niveles altos de células T CD4+ y CD8+ específicas anti-JCPyV están asociadas con supervivencia más larga de los enfermos de LMP [Berger et al., 1998; Gasnault et al., 2003; Jiang et al., 2009a].

### 3.-OBJETIVOS

Aunque la infección por el poliomavirus BK está asociada a la aparición de nefropatía intersticial y cistitis hemorrágica y el poliomavirus JC es el agente etiológico de la leucoencefalopatía multifocal progresiva; existen antecedentes bibliográficos de infección neurológica debida al poliomavirus BK y de nefropatía intersticial y cistitis hemorrágica asociadas a la infección del poliomavirus JC [Drachenberg et al., 2007; Lopes da Silva, 2011b; Mischitelli et al., 2010]. Por ello, parece recomendable establecer un diagnóstico diferencial mediante el empleo de una técnica que permita la detección simultánea de ambos agentes.

Por otra parte, la cuantificación de la carga viral es un marcador de suma importancia en el diagnóstico y monitorización de estos pacientes, y más concretamente, de los pacientes con nefropatía asociada a la infección por poliomavirus [Hirsch et al., 2005; Hirsch et al., 2002]. Por consiguiente, el primer objetivo de esta tesis fue el siguiente:

**1.-** Desarrollo y validación de una herramienta diagnóstica para la detección y cuantificación simultánea y específica de los poliomavirus humanos BK y JC en muestras clínicas de diversas patologías asociadas.

Como parte de la actividad diagnóstica del Laboratorio de Aislamiento y Detección Viral del Centro Nacional de Microbiología (CNM), durante los años 1998 a 2010, se empleó una PCR convencional anidada y múltiple capaz de amplificar el antígeno T de los poliomavirus BK, JC y SV40 [Fedele et al., 1999]. El análisis de muestras llevado a cabo durante los citados años permitió la detección de ADN del poliomavirus BK en el líquido cefalorraquídeo de 20 pacientes que eran sospechos de infección neurológica por el poliomavirus JC. Dado que no se conocía la carga viral presente en las dichas muestras ni en otros pacientes similares descritos en la bibliografía, el segundo objetivo de la tesis fue el siguiente:

**2.-** Determinación de la carga viral en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con patologías neurológicas asociadas a la infección por el poliomavirus humano BK.

En estudios previos se ha visto que la presencia de reorganizaciones en la región reguladora del JCPyV está asociada a la aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva, ya que determina el neurotropismo del virus [Vaz et al., 2000; White and Khalili, 2011]. Además, se han descrito variaciones en los aminoácidos en la proteína VP1 del poliomavirus JC exclusivas de los pacientes con dicha patología que alteran la afinidad del virus por los distintos receptores celulares [Gorelik et al., 2011; Sunyaev et al., 2009; Zheng et al., 2005b]. Por estas razones, se plantearon el tercer y cuarto objetivos:

**3.-** Caracterización de la secuencia de la región reguladora del poliomavirus BK, en muestras de líquido cefalorraquídeo y suero de los citados pacientes neurológicos, con el fin de dilucidar si la presencia de reorganizaciones en dicha región puede determinar el neurotropismo del virus.

**4.-** Caracterización de la secuencia de la proteína VP1 del poliomavirus BK, en muestras de líquido cefalorraquídeo y suero provenientes de los pacientes neurológicos, para dilucidar si existen cambios en los aminoácidos de la misma que pudiesen asociarse a la aparición de patología en SNC.

Asimismo, para las cepas del BKPyV con región reguladora reorganizada detectadas en pacientes con nefropatía intersticial se ha descrito un incremento en la capacidad replicativa y en la expresión de los genes tempranos con respecto a las correspondientes variantes arquetípicas [Gosert et al., 2008]. El mismo fenómeno se ha observado en las cepas del JCPyV con región reguladora reorganizada provenientes de pacientes con leucoencefalopatía multifocal progresiva [Gosert et al., 2010]. Teniendo en cuenta lo anterior, el quinto y último objetivo fue el siguiente:

**5.-** Análisis de la actividad de los promotores temprano y tardío de las variantes del poliomavirus BK con región reguladora reorganizada identificados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes neurológicos, mediante estudios de transfección en células Vero, y comparación de la misma con los correspondientes promotores de la variante arquetípica.

## **4.-Scientific Article: “Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies”**

### **4.1.-OBJETIVOS**

- 1.-Desarrollo de una PCR a tiempo real con control interno capaz de detectar y cuantificar, de forma específica y simultánea, el genoma de los poliomavirus humanos BK y JC.
- 2.-Análisis de la sensibilidad y especificidad de dicha técnica con un panel internacional de control de calidad para el diagnóstico molecular de los poliomavirus BK y JC.
- 3.-Determinación de la reproducibilidad intra e interensayo del método desarrollado con muestras clínicas.
- 4.-Validación de la técnica con muestras clínicas previamente analizadas mediante una PCR convencional múltiple de los poliomavirus BK y JC: orina y sangre de trasplantados renales con sospecha de nefropatía, líquidos cefalorraquídeos provenientes de pacientes con sospecha de leucoencefalopatía multifocal progresiva (VIH-positivos, en tratamiento con natalizumab y VIH-negativos) y con muestras control.

### **4.2.-CONCLUSIONES**

- 1.-La PCR a tiempo real múltiple para los poliomavirus BK y JC es específica y reproducible a juzgar por los resultados de la validación de la misma con muestras clínicas y muestras control.
- 2.- La técnica desarrollada es más sensible que la técnica convencional y, no sólo permitió la confirmación de todas las muestras previamente positivas sino que permitió la detección de cuatro nuevos casos de infección neurológica asociada a la infección del poliomavirus JC y uno, debido a la infección del poliomavirus BK.

3.- Los resultados de los análisis del panel de control de calidad determinaron que la técnica desarrollada es “muy satisfactoria” para el poliomavirus BK y “satisfactoria” para el poliomavirus JC.

4.- La mediana de la carga viral del poliomavirus BK en el líquido cefalorraquídeo de pacientes neurológicos fue de  $9 \times 10^3$  copias/ml con un rango de  $6 \times 10^2$  copias/ml y  $2 \times 10^6$  copias/ml y no se observaron diferencias significativas con la carga viral del poliomavirus JC en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con leucoencefalopatía multifocal progresiva.



## Development and validation with clinical samples of internally controlled multiplex real-time PCR for diagnosis of BKV and JCV infection in associated pathologies

Ana Bárcena-Panero<sup>a,b,\*</sup>, Juan E. Echevarría<sup>a,b</sup>, María Pilar Romero-Gómez<sup>c</sup>, Enrique Royuela<sup>a,b</sup>, Ana Castellanos<sup>a</sup>, Irene González<sup>a</sup>, Giovanni Fedele<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Viral Isolation and Detection Laboratory, Microbiology Diagnostic Service, National Microbiology Centre, Carlos III Health Institute, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Network of Biomedical Investigation Centres in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Microbiology Service, La Paz, University Hospital, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Diagnosis Orientation, National Microbiology Centre, Carlos III Health Institute, Majadahonda, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 October 2011

Received in revised form

28 November 2011

Accepted 19 December 2011

#### Keywords:

Real-time PCR

Polyomaviruses

Diagnosis

Internal control

Quantification

### ABSTRACT

This article describes the development and validation with clinical samples of an internally controlled multiplex quantitative real-time PCR (QRT-PCR) for human polyomaviruses BK (BKV) and JC (JCV). Blood and urine samples from renal transplant recipients with suspected nephropathy, and cerebrospinal fluid (CSF) specimens from AIDS, natalizumab-treated and HIV-negative patients with suspected progressive multifocal leukoencephalopathy, previously checked for BKV and JCV by conventional PCR, were tested by QRT-PCR. All samples positive by conventional PCR were confirmed by QRT-PCR. Four cases of JCV-associated neurological infection, including all those detected in natalizumab-treated patients, and one case of BKV-related neurological infection were only identified by QRT-PCR. BKV was quantified in the CSF of neurological patients for the first time. Analyses of the Quality Control for Molecular Diagnostics 2010 panel were “highly satisfactory” for BKV and “satisfactory” for JCV. The QRT-PCR is specific and reproducible. It improves the sensitivity of conventional PCR for the diagnosis of BKV and JCV infection in various diseases.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Polyomaviruses are small, nonenveloped DNA viruses that infect a wide variety of vertebrates including humans. Human polyomaviruses BK (BKV) and JC (JCV) are widespread among humans with seroprevalence rates of 82% for BKV and 39% for JCV in healthy adult blood donors [1]. Primary infection takes place during childhood and is

usually asymptomatic. After primary infection, BKV and JCV remain latent in the urinary tract [2] but also in mononuclear cells [3,4] and the central nervous system (CNS) [5]. Asymptomatic reactivation and urinary shedding have been described, especially under immunosuppression [6–9]. Pathological reactivation is generally associated with severe immunosuppressive status. BKV is the aetiological agent of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) and urethral stenosis in renal transplant recipients and also of haemorrhagic cystitis (HC) in bone marrow transplant recipients [10]. The prevalence of PVAN, in renal transplant recipients, varies from 1% to 10% [11]. Viral DNA quantification is recommended for monitoring the clinical course of PVAN and for managing the immunosuppressive therapy [12]. JCV is associated with progressive

\* Corresponding author at: Viral Isolation and Detection Laboratory, Microbiology Diagnostic Service, National Microbiology Centre, Carlos III Health Institute, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain.  
Tel.: +34 918 223 724; fax: +34 915 097 966.

E-mail addresses: [abp@isciii.es](mailto:abp@isciii.es), [anitabiogen@hotmail.com](mailto:anitabiogen@hotmail.com) (A. Bárcena-Panero).

**Table 1**

Sequences of the primers and probes used in the real-time PCR assay.

Primer or probe	Reference sequence (GenBank no.)	Sequence 5'–3'/alignment <sup>a</sup>	Position
PM2+	BKV Dunlop (V01108) JCV Mad-1 (NC.001699.1)	GCWGAAGACTCTATGYCTRTGTGG GCAGAACTCTATGTCTATGTGG GCTGACACTCTATGTCTATGTGG	4184–4206 4047–4069
PM2–	BKV Dunlop (V01108) JCV Mad-1 (NC.001699.1)	GGTAGAAGACCCYAARGACTTTCC GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACC <sup>a</sup> GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACC <sup>a</sup>	4388–4411 4251–4274
BKV probe	BKV Dunlop (V01108)	FAM-CCAGCACACATGTGTCTACT	4232–4251
JCV probe	JCV Mad-1 (NC.001699.1)	VIC-GCTTGACTGAGGAATGCATGCAG	4221–4243
IC probe <sup>b</sup>	–	NED-CGCATCACGCGCGACCTCTT	–

<sup>a</sup> Alignment of primer reverse PM2– with references sequences Dunlop (BKV) and Mad-1 (JCV).<sup>b</sup> IC probe: internal control probe.

multifocal leukoencephalopathy (PML) in AIDS patients at a rate of approximately 3% of HIV-1 seropositive individuals [13]. Recently, JCV has been related to PML in multiple sclerosis (MS) patients treated with natalizumab with an incidence of 1 in 1000 [14]. However, BKV has been detected in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with CNS disease [15–17], including PML [18,19], and JCV can be the aetiological agent of nephropathy [20,21] and HC [22–24]. Consequently, a differential diagnosis of JCV and BKV is necessary.

This study aimed to develop an internally controlled multiplex real-time PCR (QPCR) that can detect and accurately quantify both JCV and BKV in a single reaction tube. Moreover, its suitability for the diagnosis of human polyomaviruses infection in various associated pathologies has been validated with clinical samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Clinical samples

Samples were selected from those tested for polyomavirus DNA by conventional multiplex PCR of BKV, JCV and SV40 [25] in the National Microbiology Centre between 1999 and 2010. One hundred and seven blood and 94 urine specimens from 12 renal transplant recipients with suspected PVAN were checked by QPCR. Thirty CSF specimens from 29 HIV-positive patients and 26 CSF specimens from 19 MS patients treated with natalizumab, all of them with suspected PML, were also tested. In addition, 11 CSF samples from 11 HIV-negative patients with suspected PML, including two cases of leukaemia, one renal transplant recipient, one case of breast cancer, one case of lymphoma, one patient treated with corticoids, one patient treated with gamma globulins, and four patients whose clinical condition was unknown, were analysed. Subtypes of some of the samples included in the present study had been determined in a previous study [26] and so samples containing BKV subtypes Ia (2 samples), Ib-1 (5), Ib-2 (3), II (5), III (2) and IV (2) were tested.

### 2.2. Control samples

Control samples were selected from those analysed in the National Microbiology Centre between 2006 and 2009. Seven CSF samples positive for Herpes Simplex

virus (HSV) DNA, seven CSF specimens positive for human enterovirus RNA and ten CSF specimens negative for human enteroviruses and human herpesviruses by a previously described nested multiplex PCR [27] were included. Two cervical scraping samples positive for human papillomavirus DNA by conventional PCR [28] were also tested. Moreover, seven blood and seven serum specimens from immunocompetent individuals without suspected polyomavirus infection were analysed.

### 2.3. DNA extraction

Viral DNA was isolated from 200 µl of clinical samples with the QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Izasa, Spain) and eluted in 50 µl of DNase-free water following the manufacturer's instructions.

### 2.4. Primers and probes

Previously described generic primers of both BKV and JCV, PM2+ and PM2–, were used to amplify a conserved fragment of the large T antigen gene [29] (Table 1).

Two-hundred and eighty JCV complete genome sequences belonging to subtypes 1–8 and 163 BKV complete genome sequences belonging to subtypes I–IV whose subtype had been determined in previous studies [30–33] were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) and aligned with BioEdit software (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA). Specific TaqMan-MGB probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for BKV, JCV and the internal control were designed and labelled with FAM, VIC and NED dyes, respectively.

Dimers of primers and probes and self-formations of probes were tested with Primer Select software (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

### 2.5. Internal control plasmid

A previously published internal control plasmid that includes a sequence of pseudorabies virus DNA flanked by the primers PM2+ and PM2– was used [29].

### 2.6. Construction of BKV and JCV plasmids for standard curves

The BKV and JCV PCR amplimers contained in the standard control plasmids were generated by amplification of



samples positive for BKV and JCV DNA, respectively, by conventional nested PCR [29]. The PCR products were purified from the gel with a Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA) and cloned into a TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The resulting plasmids were purified using a QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Izasa, Spain) and DNA concentrations were measured by UV spectroscopy. A stock containing  $2 \times 10^8$  copies/ $\mu$ l of both BKV and JCV standard control plasmids was produced.

### 2.7. QPCR conditions

Analyses were performed on the Applied Biosystems 7500 Fast platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) but a conventional profile was run. Conditions consisted of 15 min at 95 °C and 40 cycles of 60 s at 94 °C and 90 s at 60 °C. The reaction mixture contained  $2 \times$  QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen, Izasa, Spain), 300 nM of the forward primer, 900 nM of the reverse primer, 200 nM of each probe, 1 mM of  $MgCl_2$ , 100 copies of the internal control plasmid and 5  $\mu$ l of the DNA eluted in a final volume of 30  $\mu$ l. Positive (BKV, JCV and internal control plasmids) and negative ( $H_2O$ ) controls were included in each run.

Concentrations of primers, probes,  $MgCl_2$  and internal control were optimised empirically.

### 2.8. Establishment and validation of standard curves for quantification

For the generation of standard curves, the stock of BKV and JCV plasmids was 10-fold diluted down to 2 copies/ $\mu$ l and 5  $\mu$ l of dilutions ranging from  $2 \times 10^6$  copies/ $\mu$ l to 2 copies/ $\mu$ l were assayed. Standard curves were produced in duplicate in each assay by plotting the threshold cycle values against the logarithm of final concentrations ranging from  $10^7$  to 10 copies per reaction of BKV and JCV plasmids. Quantification of BKV and JCV in samples was estimated by interpolation in the standard curves. Samples with viral loads  $>10^7$  copies per reaction were diluted. Samples with fewer than 10 copies per reaction of BKV or JCV were tested again and only consistent results were considered genuine.

The inter-assay variability of the standard curves was estimated by testing serial 10-fold dilutions from  $10^7$  to 1 copy per reaction of both BKV and JCV plasmids on three consecutive days. On day 1, triplicates of the BKV and JCV standards curves were performed to calculate the intra-assay variability and the efficiency expressed as  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ . On days 2 and 3, duplicates of the standard curves were analysed. The detection limit was set at the lowest dilution of BKV and JCV included in the standard curve that was consistently detected in all replicates on the 3 days tested.

### 2.9. Specificity of the multiplex assay

The specificity of the multiplex assay was evaluated by testing separately serial 10-fold dilutions from  $10^6$  to 10 copies per tube of each one of the standard control plasmids BKV and JCV in assays which contained all probes (BKV, JCV and internal control).

### 2.10. Quality control panel JCBKDNA10: specificity and sensitivity of the QPCR

In order to assess the specificity and sensitivity of the assay, the Quality Control for Molecular Diagnostics 2010 panel for JCV and BKV DNA (JCBKDNA10), organised in collaboration with the European Society for Clinical Virology and the European Society for Clinical Microbiology & Infectious Diseases, was analysed using 300  $\mu$ l of the samples. The panel consisted of six samples containing various concentrations of two JCV subtype 1A strains, three and two samples containing various concentrations of BKV subtypes Ib-2 and Ib-1, respectively, and one sample negative for both.

### 2.11. Inter and intra-assay variability of the QPCR

Two BKV-positive blood samples (Blood 1, 2) and two JCV-positive CSF specimens (CSF 1, 2) were extracted in four different runs. The viral loads of the DNA template from the same and different extraction assays and their replicates were quantified over four consecutive days in order to calculate the intra- and inter-assay variability.

## 3. Results

### 3.1. Reactivity across subtypes

Primers and BKV probe showed no mismatches with 98.8% of the 163 BKV sequences belonging to subtypes I–IV. Similarly, no mismatches were found with either primers or JCV probe and 93.2% of the 280 JCV sequences belonging to subtypes 1–8. Most of the remaining sequences showed single mismatches. Only five strains of subtype 7C1 and one strain of subtype 6 showed a double mismatch with primer PM2+ and JCV probe, respectively, but none of them affected the 3' end.

### 3.2. Validation of the standard curves for quantification

Intra-assay variability with standard curves ranged from 0.08% to 1.43% for BKV and from 0.11% to 1.68% for JCV. Inter-assay variability varied from 0.17% to 1.99% for BKV and from 0.17% to 2.18% for JCV.

While the ideal value of efficiency would be 2 when the slope is  $-3.2$ , efficiencies of 1.96 for BKV and 1.93 for JCV with slopes of  $-3.43$  and  $-3.51$ , respectively, were estimated. A detection limit of 10 copies per reaction of BKV and JCV was set since it was consistently detected in all the replicates of the standard curves; however, one copy of both BKV and JCV was detected in most replicates. A linear relationship from  $10^7$  to 10 copies per reaction of BKV and JCV plasmids was observed in all replicates.

### 3.3. Specificity of the multiplex assay

No cross-reactivity was observed and each plasmid was specifically detected by its corresponding probe.

**Table 2**

Intra- and inter-assay variations of the assay with two BKV-positive blood samples and two JCV-positive cerebrospinal fluid specimens.

Assay comparison	Sample	Range (copies/ml)	Mean $\pm$ standard deviation (copies/ml)	Coefficient of variation (%)
<b>BKV</b>				
Intra-assay	Blood 1	206,580–251,478	233,730 $\pm$ 15,982	6.8%
	Blood 2	10,374–15,850	12,464 $\pm$ 2177	17.5%
Inter-assay	Blood 1	157,409–252,848	198,284 $\pm$ 31,968	16.1%
	Blood 2	6914–11,405	8744 $\pm$ 2009	22.9%
<b>JCV</b>				
Intra-assay	CSF <sup>a</sup> 1	70,297–106,666	91,182 $\pm$ 14,817	16.3%
	CSF 2	2462–4423	3498 $\pm$ 743	21.2%
Inter-assay	CSF 1	45,583–83,705	69,361 $\pm$ 15,054	21.7%
	CSF 2	2590–4110	3284 $\pm$ 585	17.8%

<sup>a</sup> CSF: cerebrospinal fluid.

### 3.4. Quality control panel JCBKDNA10: specificity and sensitivity of the QPCR

Qualitative results of the analysis of the JCBKDNA10 panel were considered “highly satisfactory” for BKV and JCV according to the Quality Control for Molecular Diagnostics 2010 report (QCMD2010), meaning that all positive and negative statuses of the samples were correctly assigned. Quantitative results were “highly satisfactory” for BKV since quantification of the samples was within one standard deviation from the calculated mean for each sample and “satisfactory” for JCV since the quantitative values were within one and two standard deviations from the mean for each sample except for JCBK10-3 (10 copies/ml by QPCR; 372 copies/ml according to the QCMD 2010 report) and JC.BK10-12 (461 copies/ml by QPCR; 9750 copies/ml according to the QCMD 2010 report). As few as 100 copies/ml for BKV and 264 copies/ml for JCV could be detected, since these are the lowest viral loads of samples included in the QCMD2010 panel.

### 3.5. Intra and inter-assay variability of the QPCR

Intra and inter-assay variability with clinical samples ranged between 6.8% and 21.2% and between 16.1% and 22.9%, respectively (Table 2).

### 3.6. Validation of the QPCR with clinical samples

All samples from renal transplant recipients positive for human polyomavirus DNA found to be positive by nested PCR were also positive with QPCR (Table 3). However, 10 additional blood samples positive for BKV (median 3561 copies/ml, range 784–10,275 copies/ml) were detected by the latter method. Only 10 urine samples of patients from this group that were previously positive for both BKV and JCV showed a single infection with RT-PCR. However, the only blood sample positive for both BKV and JCV was confirmed by the QPCR (BKV, 160,866 copies/ml, JCV, 905 copies/ml).

Compared to the conventional method, the QPCR enabled the period of detectable viraemia to be lengthened in all five patients positive for BKV-DNA in blood and led to earlier detection in two of them.

The method described here not only enabled the identification of all 19 cases of JCV-related neurological infection

previously found to be positive by conventional PCR but also of four additional cases, including all those in natalizumab-treated patients with the lowest viral loads (median 279, range 263–451 copies/ml). Eight cases of BKV-associated neurological infection were detected by QPCR, instead of seven, as assessed by conventional PCR. BKV-associated neurological patients showed different clinical conditions: six HIV-positive patients (one case of meningitis, one case of encephalitis, one case of PML, one case of neuropathy with aphasia and hypoacusia and two cases with unspecified neurological alterations), one bone marrow transplant recipient with chronic myeloid leukaemia, HC and meningoencephalitis, and one case of breast cancer with PML. The median viral load of BKV in the CSF of these patients was 8667 copies/ml (range 607–1,886,509 copies/ml). BKV and JCV were detected in the CSF of two patients (BKV median 7137 copies/ml, JCV median 2958 copies/ml).

Moreover, BKV-subtypes from I to IV present in the samples were successfully detected and quantified.

All control samples including those from immunocompetent individuals or those containing papillomaviruses, enteroviruses or HSV gave negative results, demonstrating the specificity of the technique. Besides, 28 bloods and 21 urine specimens, which were obtained from three renal transplant patients with compatible clinical disease but previously negative by conventional PCR for BKV DNA in all of their samples, were also negative by QPCR.

## 4. Discussion

Only one multiplex QPCR for BKV and JCV including an internal control has been previously reported [34]. This method employs different sets of primers for the internal control and the viral targets. Here we describe another internally controlled multiplex system with a single primer pair that provides very accurate absolute quantification [35], with fewer problems due to primer interaction and at lower cost. The inclusion of an internal control enables possible inhibitions of the amplification to be detected, thereby avoiding false-negative results that could lead to erroneous therapeutic decisions. The specificity of the system is ensured by the probes that exclusively detect each of the viruses. No signal is detected with strains of phylogenetically related viruses such as papillomaviruses or with clinical samples containing other

**Table 3**

Results of BKV and JCV detection and quantification by conventional PCR and QRT-PCR in clinical samples.

Patient group	Type of sample	Results conventional PCR		Results real-time PCR			
		Percentage positive patients	Percentage positive samples	Percentage positive patients	Percentage positive samples	Median (copies/ml)	Range (copies/ml)
Renal transplant recipients with suspected PVAN <sup>a</sup>	Blood						
	BKV	41.7% (5/12)	18.7% (20/107)	41.7% (5/12)	28% (30/107)	$5.7 \times 10^3$	784– $1.7 \times 10^6$
	JCV	8.3% (1/12)	0.9% (1/107)	8.3% (1/12)	0.9% (1/107)	905	–
	Urine						
	BKV	75% (9/12)	72.3% (68/94)	66.7% (8/12)	68.1% (64/94)	$1.5 \times 10^8$	$1.7 \times 10^3$ to $3.3 \times 10^{10}$
	JCV	41.7% (5/12)	26.6% (25/94)	25% (3/12)	18.1% (17/94)	$2.2 \times 10^7$	$121-7 \times 10^8$
HIV-positive patients with suspected PML <sup>b</sup>	CSF <sup>c</sup>						
	BKV	17.2% (5/29)	20% (6/30)	20.7% (6/29)	23.3% (7/30)	$1.2 \times 10^4$	$1.9 \times 10^3$ to $1.9 \times 10^6$
	JCV	51.7% (15/29)	50% (15/30)	55.2% (16/29)	53.3% (16/30)	$1.5 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$ to $1.4 \times 10^5$
HIV-negative patients with suspected PML	CSF						
	BKV	18.2% (2/11)	18.2% (2/11)	18.2% (2/11)	18.2% (2/11)	$2.8 \times 10^3$	$607-5 \times 10^3$
	JCV	36.4% (4/11)	36.4% (4/11)	36.4% (4/11)	36.4% (4/11)	$3.9 \times 10^5$	$3 \times 10^3$ to $6.2 \times 10^6$
MS <sup>d</sup> natalizumab-treated patients with suspected PML	CSF						
	BKV	0% (0/19)	0% (0/26)	0% (0/19)	0% (0/26)	–	–
	JCV	0% (0/19)	0% (0/26)	15.8% (3/19)	11.5% (3/26)	279	263–451

<sup>a</sup> PVAN, polyomavirus-associated nephropathy.<sup>b</sup> PML, progressive multifocal leukoencephalopathy.<sup>c</sup> CSF, cerebrospinal fluid.<sup>d</sup> MS, multiple sclerosis.

viruses such as enteroviruses or HSV, which can be present in immunosuppressed patients. In addition, samples from immunocompetent individuals without suspected polyomavirus infection were negative. The limit of detection of the standard curves was set at 10 copies per reaction of BKV and JCV standard control plasmids, which is consistent with other reported multiplex QPCR detecting BKV and JCV [36,37]. Linearity from  $10^7$  to 10 copies per reaction of both BKV and JCV standard control plasmids was also assured.

The technique has been validated with a panel of samples from patients with a wide range of polyomavirus-associated clinical presentations, previously analysed by conventional multiplex PCR, including renal transplant recipients, HIV-positive patients, MS patients treated with natalizumab and patients with BKV-associated neurological infection. In most cases, the test proved to be efficient and specific as well as more sensitive than the conventional PCR. Besides, compared to the conventional method, the QPCR allowed the earlier detection of BKV viraemia in two of five renal transplant recipients positive for BKV DNA in blood, which in the practice could have led to improved clinical management. Moreover, it enabled the identification of five new cases of polyomavirus-related neurological infection, including all the positive cases of natalizumab-treated patients. In fact, JCV detection in the CSF of patients natalizumab-treated implies a very high sensitivity since JCV viral load is <500 copies/ml in most of the cases [38]. In our study, JCV viral load in these patients was always <500 copies/ml and as few as 263 copies/ml of JCV were detected in the CSF of one of them. Indeed, 100 copies/ml for BKV and 264 copies/ml for JCV are certain to be detected, as these are the lowest viral loads of samples included in the QCMD 2010 panel. Moreover, the method was able to amplify BKV subtypes I–IV in clinical samples, as expected, since no significant mismatches were observed with the BKV probe and primers. Although only the subtype of the JCV strains included in the QCMD 2010 panel was known (1A), absence or non-significant mismatches were found between JCV sequences and JCV probe and primers.

The convenience of BKV and JCV co-quantification has been noted in our study since co-infections were found not only in the urine but also in the blood of one renal transplant recipient. A putative role for JCV in PVAN has already been suggested [21]. More strikingly, BKV was detected in the CSF of eight neurological patients. Two of them were in association with JCV, but the association was absent from the other six. We have previously reported 20 patients with BKV-associated neurological infection [26] and BKV viral load in the CSF of eight of these patients was determined for the first time in the present study.

The reproducibility of the system has also been tested with clinical samples and found to be good, since variability ranges between 6.8% and 21.2% within the same assay and from 16.1% to 22.9% among different assays. However, these fluctuations should be taken into account when the effect of a treatment is being evaluated based on the evolution of viral loads over time as for monitoring PVAN patients [12]. Consequently, differences that are less than the intrinsic variability of the assay should not be considered to be genuine. Surprisingly, such confidence intervals are not usually provided for commercial QPCR tests for

BKV or JCV. Moreover, quantification is based on standard curves made with plasmids that are not subjected to DNA isolation. Indeed, native polyomavirus DNA is supercoiled [39] and therefore extremely difficult to denature. For these reasons, absolute quantification values should be considered with caution until international standard preparations become available.

In summary, the real-time PCR described here provides an accurate, reproducible and specific simultaneous detection and quantification of BKV and JCV in clinical samples. It allows sensitive diagnosis of BKV and JCV infection in various associated diseases.

## Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgements

The work was supported by Biogen Idec Iberia, Madrid, Spain. The authors would like to thank Dr. Marta Ortiz for kindly providing the papillomavirus-positive samples and to Dr. Philip Mason, English native speaker, for carefully reviewing the manuscript.

## References

- [1] Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000363.
- [2] Arthur RR, Shah KV. Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. *Prog Med Virol* 1989;36:42–61.
- [3] Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 1994;198:59–70.
- [4] Tornatore C, Berger JR, Houff SA, Curfman B, Meyers K, Winfield D, et al. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 1992;31:454–62.
- [5] Vago L, Cinque P, Sala E, Nebuloni M, Caldarelli R, Racca S, et al. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;12:139–46.
- [6] Bendixen S, Rekvig OP, Van Ghelue M, Moens U. VP1 DNA sequences of JC and BK viruses detected in urine of systemic lupus erythematosus patients reveal no differences from strains expressed in normal individuals. *J Gen Virol* 2000;81:2625–33.
- [7] Bhattacharjee S, Chakraborty T. High reactivation of BK virus variants in Asian Indians with renal disorders and during pregnancy. *Virus Genes* 2004;28:157–68.
- [8] Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS. BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 1991;65:4515–9.
- [9] Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, et al. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 2007;45:193–8.
- [10] Dropulic LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:11–8.
- [11] Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation* 2009;87:621–30.
- [12] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005;79:1277–86.
- [13] Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 2010;61:35–47.
- [14] Berger JR. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Rheum Dis* 2006;65(Suppl. 3):iii48–53.
- [15] Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, et al. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* 1999;13:1071–5.

- [16] Vallbracht A, Lohler J, Gossmann J, Gluck T, Petersen D, Gerth HJ, et al. Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol* 1993;143:29–39.
- [17] Voltz R, Jager G, Seelos K, Fuhry L, Hohlfeld R. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol* 1996;53:101–3.
- [18] Cabrejo L, Diop M, Blohorn-Sense A, Mihout B. Progressive BK virus associated multifocal leukoencephalopathy in an immunocompromised patient treated with corticosteroids. *Rev Neurol (Paris)* 2005;161:326–30.
- [19] Hix JK, Braun WE, Isada CM. Delirium in a renal transplant recipient associated with BK virus in the cerebrospinal fluid. *Transplantation* 2004;78:1407–8.
- [20] Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, et al. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 2007;84:323–30.
- [21] Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, Angonin R, Fontaniere B, Moret H. The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation* 2003;76:1653–5.
- [22] Garcia Ligerio J, Mora Peris B, Garcia Garcia F, Navas Pastor J, Tomas Ros M, Sempere Gutierrez A, et al. Hemorrhagic cystitis caused by BK and JC polyomavirus in patients treated with bone marrow transplantation: clinical features and urologic management. *Actas Urol Esp* 2002;26:104–10.
- [23] Gorczynska E, Turkiewicz D, Rybka K, Toporski J, Kalwak K, Dyla A, et al. Incidence, clinical outcome, and management of virus-induced hemorrhagic cystitis in children and adolescents after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:797–804.
- [24] Mischitelli M, Fioriti D, Anzivino E, Bellizzi A, Barucca V, Boldorini R, et al. Viral infection in bone marrow transplants: is JC virus involved? *J Med Virol* 2010;82:138–45.
- [25] Fedele CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods* 1999;82:137–44.
- [26] Bárcena-Panero A, Van Ghelue M, Khan MT, Echevarria JE, Fedele G, Moens U. BK virus-associated infection in cerebrospinal fluid of neurological patients and mutation analysis of the complete VP1 gene in different patient groups. *J Cell Physiol* 2012;227:136–45.
- [27] Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 1997;66:39–50.
- [28] Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357–61.
- [29] Fedele CG, Avellon A, Ciardi M, Delia S, Tenorio A. Quantitation of polyomavirus DNA by a competitive nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2000;88:51–61.
- [30] Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol* 2009;83:2285–97.
- [31] Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Melico-Silvestre A. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol* 2010;82:494–504.
- [32] Shackelton LA, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. JC virus evolution and its association with human populations. *J Virol* 2006;80:9928–33.
- [33] Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, et al. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J Gen Virol* 2009;90:144–52.
- [34] Dumonceaux TJ, Mesa C, Severini A. Internally controlled triplex quantitative PCR assay for human polyomaviruses JC and BK. *J Clin Microbiol* 2008;46:2829–36.
- [35] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190–212.
- [36] McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3379–88.
- [37] Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Spinelli G, Lo Muzio L, Rubini C, et al. Absence of simian virus 40, BK, and JC polyomavirus DNA in squamous cell carcinoma limited to the oral cavity. *Head Neck* 2010;32:375–80.
- [38] Clifford DB, De Luca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 2010;9:438–46.
- [39] Weil R, Vinograd J. The cyclic helix and cyclic coil forms of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963;50:730–8.

## **5.- Scientific Article: “BK polyomavirus with archetypal and rearranged non-coding control regions are present in cerebrospinal fluids from patients with neurological complications”**

### **5.1.-OBJETIVOS**

1.- Determinación de la conformación de la región reguladora de las cepas del poliomavirus BK detectadas en los pacientes neurológicos y de otras variantes detectadas en trasplantados renales, trasplantados de médula ósea y embarazadas para valorar si las cepas neurológicas presentan reorganizaciones características que puedan determinar el neurotropismo del virus.

2.-Comparación de la actividad de los promotores temprano y tardío de las variantes neurológicas del poliomavirus BK cuya región reguladora es reorganizada con respecto a los correspondientes promotores temprano y tardío de la cepa arquetípica.

### **5.2.-CONCLUSIONES**

1.- Las variantes neurológicas presentaron una conformación arquetípica en 14 de los 20 pacientes neurológicos y reorganizada, pero similar a otras previamente descritas y no neurotrópicas, en los seis pacientes restantes, y; por lo tanto, la presencia de reorganizaciones en la región reguladora del poliomavirus BK no es una condición ni necesaria ni suficiente para el desarrollo de patología neurológica.

2.-La ausencia del poliomavirus BK del suero de 5 de 7 pacientes neurológicos, aun estando presente en las muestras de líquido cefalorraquídeo tomadas en la misma fecha, y la detección, en los dos pacientes restantes, de secuencias arquetípicas en suero sugiere que la infección neurológica debida al poliomavirus BK no parece tener su origen en la diseminación de una cepa reorganizada desde la sangre.

3.- La actividad de cinco de seis promotores tempranos y cuatro de seis promotores tardíos pertenecientes a variantes neurológicas cuya región reguladora era reorganizada demostró ser significativamente mayor que la de los correspondientes promotores arquetípicos en estudios de transfección con células Vero.



# BK polyomavirus with archetypal and rearranged non-coding control regions are present in cerebrospinal fluids from patients with neurological complications

Ana Bárcena-Panero,<sup>1,2,3</sup> Juan E. Echevarría,<sup>1,3</sup> Marijke Van Ghelue,<sup>4</sup> Giovanni Fedeles,<sup>5</sup> Enrique Royuela,<sup>1,3</sup> Nancy Gerits<sup>2</sup> and Ugo Moens<sup>2</sup>

## Correspondence

Ugo Moens

ugo.moens@uit.no

<sup>1</sup>Viral Isolation and Detection Laboratory, Microbiology Diagnostic Service, National Microbiology Centre, Carlos III Health Institute, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Medical Biology, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø, N-9037 Tromsø, Norway

<sup>3</sup>Network of Biomedical Investigation Centres in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Medical Genetics, University Hospital of Northern-Norway, N-9038 Tromsø, Norway

<sup>5</sup>Department of Diagnosis Orientation, National Microbiology Centre, Carlos III Health Institute, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

BK polyomavirus (BKPyV) has recently been postulated as an emerging opportunistic pathogen of the human central nervous system (CNS), but it is not known whether specific strains are associated with the neurotropic character of BKPyV. The presence of BKPyV large T-antigen DNA was examined in 2406 cerebrospinal fluid (CSF) samples from neurological patients with suspected JC polyomavirus infection. Twenty patients had a large T-antigen DNA-positive specimen. The non-coding control region (NCCR) of the BKPyV strains amplified from CSF from these 20 patients, strains circulating in renal and bone marrow transplant recipients and from healthy pregnant women was sequenced. The archetypal conformation was the most prevalent in all groups and 14 of the neurological patients harboured archetypal strains, while the remaining six patients possessed BKPyV with rearranged NCCR similar to previously reported variants from non-neurological patients. Transfection studies in Vero cells revealed that five of six early and four of six late rearranged promoters of these CSF isolates showed significantly higher activity than the corresponding archetypal promoter. From seven of the neurological patients with BKPyV DNA-positive CSF, paired serum samples were available. Five of them were negative for BKPyV DNA, while serum from the remaining two patients harboured BKPyV strains with archetypal NCCR that differed from those present in their CSF. Our results suggest that NCCR rearrangements are not a hallmark for BKPyV neurotropism and the dissemination of a rearranged NCCR from the blood may not be the origin of BKPyV CNS infection.

Received 15 February 2012

Accepted 1 May 2012

## INTRODUCTION

BK polyomavirus (BKPyV) is a small dsDNA virus that belongs to the family *Polyomaviridae* which also contains the human species JC (JCPyV) (Padgett *et al.*, 1971), WU

(Gaynor *et al.*, 2007), KI (Allander *et al.*, 2007), Merkel cell polyomavirus (Feng *et al.*, 2008) trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (van der Meijden *et al.*, 2010), human polyomaviruses 6, 7 and 9 (Schowalter *et al.*, 2010; Scuda *et al.*, 2011). BKPyV is widely distributed in the human population and a seroprevalence rate of 82 % in healthy adult blood donors has been reported (Kean *et al.*, 2009). BKPyV's primary asymptomatic infection usually occurs during early childhood (3–4 years) and the respiratory (Sundsford *et al.*, 1994) and oral–faecal (Bofill-Mas *et al.*, 2000) routes have been postulated. Vertical

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the RRA to RRF and for the WWM to WWM17 sequences of the NCCR of BK polyomavirus are JQ513609–JQ513614 and JQ513592–JQ513608, respectively.

Supplementary tables are available with the online version of this paper.



transmission soon after birth or during pregnancy has been suggested (Boldorini *et al.*, 2011). After primary infection, latency is established mostly in the urogenital tract (Arthur *et al.*, 1989), but also in mononuclear cells (Dörries *et al.*, 1994; Tornatore *et al.*, 1992) and in the central nervous system (CNS) (Vago *et al.*, 1996). In fact, BKPyV DNA has been detected in brain tissue and cerebrospinal fluid (CSF) of both immunocompetent and immunocompromised subjects with or without neurological symptoms (Behzad-Behbahani *et al.*, 2003a, b; Voltz *et al.*, 1996). Reactivation of BKPyV is not uncommon and is frequently associated with asymptomatic urinary shedding in diabetic patients, increasing age and during pregnancy (Bendiksen *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2007). However, pathological reactivation is generally related to patients under severe immunosuppression such as renal transplant and bone marrow transplant recipients where BKPyV is the aetiological agent of nephropathy (PVAN) and haemorrhagic cystitis (HC), respectively. Moreover, although the neurotropic character is mostly related to JCPyV, which is strongly associated to progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), BKPyV has been postulated as an emerging opportunistic pathogen of the CNS (Lopes da Silva, 2011a). During almost 20 years, only 25 cases of BKPyV-associated neurological infections have been reported (Behre *et al.*, 2008; Behzad-Behbahani *et al.*, 2003a, b; Bratt *et al.*, 1999; Cabrejo *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2008; Friedman & Flanders, 2006; Garavelli & Boldorini, 2002; Hedquist *et al.*, 1999; Hix *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2003; Kinnaird & Anstead, 2010; Lesprit *et al.*, 2001; Lopes da Silva *et al.*, 2011; Stoner *et al.*, 2002; Vallbracht *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 2007; Voltz *et al.*, 1996). BKPyV-associated neurological infection has been described in healthy individuals with reduced clinical involvement (Behzad-Behbahani *et al.*, 2003a; Voltz *et al.*, 1996). However, most of the cases were immunosuppressed patients including AIDS patients, bone marrow transplant recipients suffering from encephalitis, or meningoencephalitis associated with renal impairment (Behre *et al.*, 2008; Behzad-Behbahani *et al.*, 2003b; Bratt *et al.*, 1999; Friedman & Flanders, 2006; Garavelli & Boldorini, 2002; Jørgensen *et al.*, 2003; Kinnaird & Anstead, 2010; Lesprit *et al.*, 2001; Lopes da Silva *et al.*, 2011).

In a previous study of our group, 20 new cases of BKPyV-associated neurological infection were reported (Bárcena-Panero *et al.*, 2012). DNA encoding the entire VP1 protein was successfully amplified from CSF from 14/20 of these patients and sequenced. Most of them suffered from AIDS and their neurological presentation was quite heterogenic, being PML the most common affection. VP1 sequences obtained from those patients were compared to the VP1 sequences detected in the blood of patients with other pathological conditions such as renal and bone marrow transplant recipients and in the urine of healthy pregnant women. Our results indicated that the mutations in BKPyV VP1 sequence seem to be frequent and independent of the development of BKPyV-associated neurological infection, suggesting that polymorphism in the VP1 protein does not

appear to be the major determinant of neurotropism of BKPyV.

The BKPyV genome is organized into three functional domains: the hypervariable non-coding control region (NCCR) and the conserved early and late regions (Seif *et al.*, 1979). The NCCR contains the origin of replication (O-block) as well as the transcriptional control region that includes the promoter and enhancer for transcription of the early and late genes. The archetypal NCCR is arbitrarily divided into transcription factors binding regions O (142 bp), P (68 bp), Q (39 bp), R (63 bp) and S (63 bp) (Markowitz & Dynan, 1988; Moens *et al.*, 1995). BKPyV strains isolated from the urine of immunocompetent individuals and immunosuppressed patients contain the archetypal NCCR architecture known as WW (Bhattacharjee & Chakraborty, 2004; Chang *et al.*, 1996; Egli *et al.*, 2009; Flaegstad *et al.*, 1991; Markowitz *et al.*, 1991; Rubinstein & Harley, 1989). However, after propagation in cell culture, strains showing rearranged NCCR take the place of BK WW strain (Flaegstad *et al.*, 1991; Rubinstein *et al.*, 1991; Sundsfjord *et al.*, 1990). Rearrangements consist of complete or partial duplications or deletions of the NCCR-blocks. BKPyV variants with rearranged NCCR have been detected in patients suffering from PVAN, HC and autoimmune diseases (Sugimoto *et al.*, 1989; Sundsfjord *et al.*, 1999), but not in all patients (Anzivino *et al.*, 2011; Boldorini *et al.*, 2005; 2009; Carr *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007). In fact, the dominant structure of NCCR found in those patients corresponded to the archetypal form and therefore rearrangements seem to be neither necessary nor a sufficient condition for reactivation of the virus and the development of disease. In an elegant study, strains with rearranged NCCR showed to emerge and substitute the WW variants that were predominant in the plasma of PVAN patients. Moreover, the appearance of the rearranged forms was correlated with significantly higher plasma viral load (Gosert *et al.*, 2008). *In vitro* studies demonstrated that rearranged variants identified in biopsy specimens of some of these patients displayed increasing early gene expression, replication and cytopathology compared with WW. In a recent study, the main functional regions of BKPyV genome, NCCR, early and late regions, were independently analysed and the NCCR region was shown to be the major determinant of replication in primary renal proximal tubule epithelial cells (Broekema *et al.*, 2010).

The NCCR architecture of BKPyV neurological strains has only been characterized in one leukaemia patient and in one AIDS patient, both suffering from meningoencephalitis and PVAN (Jørgensen *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2002). Variants with rearranged NCCR were identified in the CSF and brain of both patients, while the WW form was excreted in the urine. The presence of the rearranged strains exclusively in specimens from the CNS could be explained by viral adaptation to specific host tissues. However, because only two cases have been described, a larger number of patients should be studied.

The aim of this study was to investigate if a specific NCCR conformation could be the determinant for neurotropism of BKPyV. As aforementioned, 20 neurological patients with a CSF sample positive for BKPyV large T-antigen (LT-ag) DNA were previously reported (Bárcena-Panero *et al.*, 2012). In the present study, the NCCR sequence of these neurological BKPyV isolates was determined and compared to the NCCR sequences from strains circulating in renal transplant recipients, bone marrow transplant patients and healthy pregnant women in order to elucidate whether rearrangements are involved in BKPyV neurotropism. Moreover, with the purpose of determining if those rearrangements confer better replication abilities to the neurological strains, the activities of the early and late promoters of the neurological rearranged strains were compared with those of the archetypal strain.

## RESULTS

### Amplification and sequencing of BKPyV NCCR DNA in neurological patients and in controls

Positive amplification of BKPyV NCCR DNA was achieved in the CSF of 20 neurological patients (NP1–NP20; Table 1) previously positive for BKPyV LT-ag DNA. Complete BKPyV NCCR sequences were obtained from 23 of 27 CSF samples and four of 22 sera specimens belonging to these 20 patients. Patients NP4 and NP15 had CSF samples that were PCR positive for both BKPyV and JCPyV LT-ag DNA, while CSF specimens of patients NP1, NP3, NP5, NP10 and NP18 were positive for herpes simplex virus (HSV), human herpesvirus 6 (HHV6), Epstein–Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) and EBV, and EBV DNA, respectively.

Amplification and sequencing of BKPyV NCCR DNA were also completed for 37 blood samples and one serum sample from 38 of 44 kidney transplant recipients (referred to as RTR21–58; Table 2), five of five blood and 16 of 17 urine specimens from six bone marrow transplant recipients (referred to as BMT59–64; Table 2) and five urine samples from 5 of 11 pregnant women (referred to as PW1–5; Table 2).

### NCCR architecture of BKPyV isolates in CSF from patients with neurological diseases

The BKPyV NCCR sequences obtained from the neurological patients and the pathological and non-pathological controls are shown in Tables 1 to 3 and Fig. 1. Both rearranged and archetypal NCCR architectures could be observed in the CSF of the neurological patients and a specific NCCR conformation could not be associated with the BKPyV neurological strains.

Six patients (30 %) harboured rearranged variants RRA to RRF (GenBank accession nos JQ513609–JQ513614) in their CSF compared with the 7 of 44 (16 %) transplant recipients including 6 of 38 RTR and one of six BMT that

contained BKPyV isolates with rearranged NCCR in their blood (RRG to RRM, GenBank accessions nos JQ513615–JQ513621) and to none of the five pregnant women. Although a higher frequency of rearrangements could be observed in the neurological patients differences were not statistical significant. The NCCR conformation of the rearranged forms is depicted in Fig. 1. The architecture of these rearranged NCCR in the BKPyV strains present in CSF of neurological patients are not unique because strains with similar NCCR anatomy have been previously reported in isolates from other patient groups (Table S1, available in JGV Online). The archetypal NCCR contains a plethora of putative binding sites for transcription factors (Table S2). Due to the rearrangements, putative transcription factor binding sites are created or removed in the rearranged NCCRs (Table S3). Rearranged variants RRA to RRF were isolated from five human immunodeficiency virus (HIV) positive (NP5, NP11, NP12, NP17 and NP20) and one HIV negative, immunosuppressed (NP7) patient. For patients NP5, NP17 and NP20 subsequent CSF specimens were available and sequence analysis of the BKPyV NCCR in these samples revealed conservation of the NCCR in the consecutive sample. Variants RRA, RRB and RRF showed a linear conformation (OPQRS) although large deletions of one or more of the blocks were detected, while variants RRC to RRE had non-linear conformations due to large deletions or/and duplications (Fig. 1).

CSF of 14 neurological patients (NP1–4, NP6, NP8–10, NP13–16, NP18 and NP19) harboured strains with archetypal WW NCCR (Table 1) that was also the most common strain identified in different samples of both healthy individuals and pathological controls (Table 2). A total of 17 different WW strains (WWM to WWM17, GenBank accession nos JQ513592–JQ513608) were reported according to the point mutations (Tables 3 and 3a). Variants WWM to WWM7 were detected in the CSF of neurological patients. WWM was the most frequently found variant, being identified in the CSF from nine of the patients with different clinical conditions (NP1, NP2, NP6, NP8, NP9, NP10, NP14, NP16 and NP19). Variants WWM5, WWM7 and WWM4, which were detected in the CSF of NP13 and NP18 and in the serum of NP5, respectively, were exclusive for the NP group. Remarkably, WWM17 was exclusively identified in the urine of pregnant healthy controls.

### Early and late promoter activity of the rearranged NCCRs of the BKPyV strains detected in CSF differed significantly from archetypal WW NCCR

Previous studies have shown that rearrangement in the NCCR changes the transcriptional strength of both the early and late promoters (Gosert *et al.*, 2008; Markowitz *et al.*, 1990; Moens *et al.*, 1995). The promoter activity of the rearranged NCCR of BKPyV variants isolated from CSF has not been tested so far (Jørgensen *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2002). Therefore, we compared the early and late transcriptional activities of the different NCCR variants

**Table 1.** Detection of BKPyV NCCR, human herpesviruses and human enteroviruses DNA by PCR in samples obtained from neurological patients

CSF, Cerebrospinal fluid; Neg, negative; NT, not tested; BMT, bone marrow transplant recipient; HC, haemorrhagic cystitis; NA, not available; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy.

Patient	Clinical condition	Sample	Date of sampling	NCCR structure	PCR for other viruses†
NP1 (M, 32)*	HIV, meningitis	CSF 1	22/04/1998	Neg	Neg
		CSF 2	08/02/1999	WWM‡	HSV
NP2 (M, 26)	HIV, encephalitis	CSF	19/06/2000	WWM	Neg
NP3 (M, 19)	Chronic myeloid leukaemia, BMT, HC, meningoencephalitis	CSF 1	13/06/2001	WWM3	HHV6
		Serum 1	13/06/2001	NT	
		CSF 2	13/07/2001	Neg	Neg
		Serum 2	13/07/2001	NT	
		CSF 3	17/07/2001	NT	NA
		Serum 3	17/07/2001	NT	
		Serum 4	20/07/2001	NT	
		Serum 5	30/07/2001	NA	
NP4 (M, 56)	HIV	CSF	28/11/2001	WWM3	JCPyV
NP5 (F, 47)	HIV, neuropathy, brain astrocytome and death	CSF 1	18/01/2002	RR§ A	EBV
		CSF 2	25/02/2002	RRA	NA
		Serum	25/02/2002	WWM4	
		Blood	25/02/2002	Neg	
NP6 (M, 36)	Immunocompetent, encephalitis	CSF 1	28/02/2002	WWM	Neg
		Serum 1	28/02/2002	Neg	
		CSF 2	14/03/2002	Neg	Neg
		Serum 2	14/03/2002	Neg	
NP7 (M, 68)	Immunosuppressed HIV-negative, fever and disorientation	CSF	14/03/2002	RRB	Neg
NP8 (F, 73)	Breast cancer, PML	CSF	09/08/2002	WWM	Neg
		Serum	09/08/2002	WWM2	
NP9 (F, 13)	Chronic myeloid leukaemia, convulsive status, HC	Six sera (1–6)	10/05/2002–31/10/2002	Neg	
		CSF	19/11/2002	WWM	Neg
		Serum 7	19/11/2002	Neg	
NP10 (F, NA)	HIV, PML	CSF	02/12/2003	WWM	CMV,EBV
NP11 (M, NA)	HIV, PML	CSF	27/01/2004	RRC	Neg
NP12 (M, 37)	HIV, Brain lymphoma	CSF	12/02/2004	RRD	Neg
NP13 (F, 5)	Blackfan-Diamond anaemia, encephalopathy, BMT, HC	CSF	23/03/2004	WWM5	Neg
		Serum 1	23/03/2004	Neg	
		Serum 2	12/04/2004	WWM6	
		Serum 3	13/04/2004	WWM6	
		Two sera (4–5)	14/07/2006–21/03/2007	Neg	NEG
NP14 (M, NA)	HIV, PML	CSF	11/10/2004	WWM	NEG
NP15 (M, NA)	HIV, PML	CSF	10/01/2005	WWM3	JCPyV
NP16 (F, 44)	HIV, encephalopathy	CSF	01/04/2005	WWM	Neg
NP17 (M, 48)	HIV, encephalopathy	CSF 1	13/06/2005	RRE	Neg
		CSF 2	20/06/2005	RRE	Neg
		Serum	20/06/2005	Neg	
NP18 (F, 52)	Multiple sclerosis	CSF	10/05/2007	WWM7	EBV

**Table 1.** cont.

Patient	Clinical condition	Sample	Date of sampling	NCCR structure	PCR for other viruses†
NP19 (M, 43)	HIV, encephalopathy	CSF	19/09/2007	WWM	Neg
NP20 (M, 45)	HIV, PML	CSF 1	14/12/2010	RRF	Neg
		CSF 2	30/12/2010	RRF	Neg

\*Male or female, age.

†The presence of other neurological viruses in the CSF of the neurological patients was evaluated by multiplex nested PCR of the LT-ag of BKPyV, JCPyV and SV40 and by a multiplex nested PCR that detects HSV, varicella-zoster virus (VZV), CMV, HHV6, EBV and human enteroviruses (EVs).

‡WWM variants contain the archetypal NCCR structure except for single point mutations, nucleotide insertions and deletions (see Table 3).

§RRR variants contain major modifications of the archetypal NCCR structure by duplications and/or deletions.

characterized in BKPyV strains detected in CSF with that of the WW archetype. We also included the NCCR of the Dunlop strain as this isolate is often used in studies with BKPyV. This strain has an OPPPS NCCR structure (Moens *et al.*, 1995).

Except for variant RRA, all rearranged variants had significantly higher early promoter activity compared with the archetype (Fig. 2). RRA possessed a significantly weaker promoter than the archetype. This variant has the linear OPQRS anatomy, but contains a 10 bp deletion in its R-block. This deletion removes putative binding sites for several transcription factors (Table S3). The RRB and RRF variants also retain the linear OPQRS NCCR anatomy, but have deletions in the O, P, R and the R- and S-blocks, respectively. Both displayed higher (5.5-fold and 2.5-fold, respectively) early promoter activities than the archetype in this assay. Of the CSF-circulating BKPyV strains with non-linear OPQRS NCCR anatomy, RRC had the highest early promoter activity (4.2 times higher than the archetype). This variant has an OPQRPQRS anatomy. RRD with a partial duplication of the P-block, and RRE with two incomplete P-blocks and a partial duplication of the Q-block also showed higher early promoter activity than archetypal NCCR. All variants had weaker early promoter activity than the Dunlop strain.

The late promoter activity of variants RRA to RRE and the Dunlop strain was significantly different from the archetypal being 1.3- to 2.4-fold higher for the variants RRB, RCC, RRD and RRE and ~30 % weaker for the variants RRA and the Dunlop strain.

### NCCR architecture in the sera from neurological patients with BKPyV-positive CSF

For seven neurological patients (NP3, NP5, NP6, NP8, NP9, NP13 and NP17), sera specimens paired to the CSF sample were available. No NCCR PCR product was obtained for the sera of five of these patients, while the sera of patients NP5 and NP8 harboured isolates with an archetypal NCCR (Table 1). In NP5, the rearranged form RRA was found in CSF, while an isolate with an archetypal

NCCR (WWM4) was circulating in her serum. The serum of NP8 contained BKPyV with WWM2 NCCR, while WWM NCCR was detected in the CSF of this patient. In patient NP13, whose paired serum sample was negative, BKPyV NCCR DNA could be detected in two serum samples collected at later time points. Both of these contained BKPyV with WWM6 NCCR, while BKVPyV with WWM5 was present in her CSF. In the only patient with sera collected prior to the positive CSF (NP9), BKPyV DNA could not be detected in sera.

## DISCUSSION

BKPyV is considered a nephrotropic virus that establishes a persistent, harmless infection in immunocompetent individuals (Hirsch & Steiger, 2003; Reploeg *et al.*, 2001). Although, BKPyV resides mainly in the kidney after primary infection, it may also occupy other locations such as the CNS since it has been identified in the brain of normal individuals (De Mattei *et al.*, 1995; Elsner & Dörries, 1992). Moreover, recent findings indicate that BKPyV may be an opportunistic neurotropic agent because BKPyV DNA has been detected in the CNS, CSF and eye. Moreover, BKPyV seems to be associated with malignant and non-malignant neurological diseases (Bárcena-Panero *et al.*, 2012; Behzad-Behbahani *et al.*, 2003b; Bratt *et al.*, 1999; Hammarin *et al.*, 1996; Hix *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2003; Lopes da Silva, 2011a, b; Moens & Johannessen, 2008; Ribeiro *et al.*, 2010; Ryschkewitsch *et al.*, 2004; Stoner *et al.*, 2002; Vago *et al.*, 1996; Vallbracht *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 2007; Voltz *et al.*, 1996). Our study confirmed that BKPyV can occasionally be present in CSF from patients with neurological diseases. Clinical isolates typically possess point mutations or partial/complete duplications and deletions of the P-, Q-, R- and S-blocks, which constitute the transcriptional control region (Moens & Van Ghelue, 2005; Sharma *et al.*, 2007). So far, the NCCR anatomy of two BKPyV strains isolated from CSF have been described; one from an AIDS patient and the other from a leukaemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis (Jørgensen *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2002). Both



**Table 2.** Clinical data and results of the NCCR analysis from the clinical patients studied

RTR, Renal transplant recipients; PVAN, polyomavirus-associated nephropathy; CRI, chronic renal insufficiency; NA, not available; BMT, bone marrow transplant recipients; HC, haemorrhagic cystitis; PW, pregnant woman.

Patient	Clinical condition	Gender	Age (years)	Sample	NCCR structure
RTR21	Biopsy-confirmed PVAN	Male	58	Blood	WWM*8
RTR22	CRI	Female	47	Blood	WWM9
RTR23	Biopsy-confirmed PVAN	Male	58	Blood	RR†G
RTR24	NA	NA	NA	Blood	RRH
RTR25	NA	NA	NA	Blood	WWM
RTR26	Suspicious of PVAN	Male	55	Blood	RRI
RTR27	CRI	Male	NA	Blood	WWM3
RTR28	NA	Male	NA	Blood	WWM2
RTR29	Suspicious of PVAN	Male	36	Blood	WWM
RTR30	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM9
RTR31	Suspicious of PVAN	Female	53	Blood	WWM3
RTR32	Suspicious of PVAN	Female	NA	Blood	WWM10
RTR33	Suspicious of PVAN, secondary CRI	Female	56	Blood	WWM2
RTR34	NA	Male	NA	Blood	RRJ
RTR35	CRI	Male	73	Blood	WWM9
RTR36	NA	Female	NA	Blood	WWM3
RTR37	Suspicious of PVAN	Female	36	Blood	WWM2
RTR38	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM2
RTR39	Suspicious of PVAN	Female	44	Blood	WWM
RTR40	Suspicious of PVAN, CRI	Male	50	Blood	WWM11
RTR41	Suspicious of PVAN, terminal CRI	Female	38	Blood	WWM12
RTR42	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM
RTR43	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM2
RTR44	Suspicious of PVAN, CRI	Male	73	Blood	WWM13
RTR45	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM6
RTR46	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	WWM
RTR47	CRI	Female	55	Blood	WWM3
RTR48	NA	Female	NA	Blood	WWM2
RTR49	NA	Female	NA	Blood	WWM14
RTR50	CRI	Male	46	Blood	RRK
RTR51	NA	Male	NA	Blood	WWM
RTR52	CRI	Male	56	Blood	WWM6
RTR53	NA	Male	NA	Blood	WWM2
RTR54	NA	Female	NA	Blood	WWM3
RTR55	NA	Female	41	Blood	WWM9
RTR56	NA	Male	57	Blood	RRL
RTR57	Suspicious of PVAN	Male	28	Serum	WWM15
RTR58	NA	Male	38	Blood	WWM14
BMT59	Acute lymphoblastic leukaemia, HC	Male	10	Blood	WWM
BMT60	HC	Female	13	Urine	WWM
				Urine 1	WWM3
				Urine 2	WWM3
				Urine 3	WWM3
				Urine 4	WWM3
				Urine 5	WWM
				Blood	RRM
				Urine 6	WWM3
				Urine 7	WWM3
				Urine 8	WWM3
BMT61	NA	Female	45	Urine 9	WWM3
				Urine 1	WWM16
				Urine 2	WWM16
				Blood	WWM16

**Table 2.** cont.

Patient	Clinical condition	Gender	Age (years)	Sample	NCCR structure
BMT62	Diffuse large B-cell lymphoma; HC	Female	20	Urine 1	WWM6
				Blood	WWM6
				Urine 2	WWM6
BMT63	Dendritic cells leukaemia; HC	Male	15	Urine	WWM2
BMT64	NA	Male	12	Blood	WWM8
				Urine	WWM8
PW1	Healthy pregnant woman	Female		Urine	WWM17
PW2	Healthy pregnant woman	Female		Urine	WWM17
PW3	Healthy pregnant woman	Female		Urine	WWM17
PW4	Healthy pregnant woman	Female		Urine	WWM17
PW5	Healthy pregnant woman	Female		Urine	WWM17

\*WW variants contain the archetypal NCCR structure with the consensus sequence or except for single point mutations, nucleotide insertions and deletions (see Table 3).

†RR variants contain major modifications of the archetypal NCCR structure by deletions or duplications (see Fig. 1).

isolates had a rearranged NCCR which made the authors speculate that these variants replicate better in neuronal cells. Similar to JCPyV, the aetiological agent of PML, it has been postulated that these strains with rearranged NCCR may be involved in the initiation and/or development of the neuropathological condition. While the archetypal NCCR sequence is consistently detected in the kidney and urine of immunocompromised and healthy individuals and is not infectious in tissue culture models, rearranged variants have been identified in the brain and other tissues of PML patients (Marshall & Major, 2010; Sabath & Major, 2002; White & Khalili, 2011). Identically rearranged forms circulated in CSF and plasma of PML patients (Pfister *et al.*, 2001), suggesting that JCPyV can migrate from blood to brain before developing PML. The situation with BKPyV in neurological patients seems to differ from that of JCPyV in PML patients. CSF specimens from most patients contained non-rearranged archetypal strains and the rearrangements detected in the CSF of the neurological patients had a composition very similar to those observed in BKPyV isolates found in different biosamples from non-neurological patients (Table S1). This suggests that rearrangement of the NCCR does not seem to be a required condition for viral replication in neural tissue and for the development of BKPyV-associated neurological infection. These results are in agreement with previous studies proposing that rearrangements are not a prerequisite for the pathogenesis of other BKPyV-associated illnesses such as PVAN or HC (Boldorini *et al.*, 2005; 2009; Carr *et al.*, 2006; Randhawa *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007).

On the other hand, for those patients with paired serum and CSF specimens, serum is generally negative for NCCR DNA (five of seven). Moreover, for the two patients whose serum and CSF were positive (NP5 and NP8), non-rearranged NCCR was detected (Table 1) and different NCCR sequences were identified in each compartment. A variant presenting a rearranged NCCR that confers its

neurotropic abilities so it is able to spread from the blood-stream through the haematoencephalic barrier does not seem to be the origin of BKPyV-associated neurological infection. Local reactivation of the virus latent in brain seems to be a more plausible hypothesis for the initiation of the CNS infection though data provided in this study are not enough to conclude it.

Based on the point mutations, we have arbitrarily classified the archetypal sequences into 17 different variants with WWM being the most common sequence in the group of neurological patients. The strain WWM17 was exclusively identified in urine of healthy pregnant women confirming previous studies that had shown that pregnant women shed BKPyV with a non-rearranged archetypal NCCR with only subtle alterations, including point mutations or single nucleotide insertions or deletions (Bhattacharjee & Chakraborty, 2004; Chang *et al.*, 1996; Markowitz *et al.*, 1991). All of these pregnant women are native from Norway (Tromsø and Stavanger) (Bendiksen *et al.*, 2000), while the remaining patients all came from Spain. Interestingly, WWM17 was previously reported in the urine from a group of patients from Tromsø (WWT) (Sundsford *et al.*, 1990) proposing that WWM17 is circulating at least in that particular location.

The CSF of the remaining six patients harboured a non-archetypal NCCR structure with major deletions and rearrangements. Three of the NCCR variants, RRA (NP5), RRB (NP7) and RRF (NP20), still had the linear OPQRS structure, but with major deletions in one or several of the blocks. Variants RRC (OPQRPQRS), RRD (OPPQRS) and RRE (OPQPQRS) had major duplications and deletions. Previous studies have shown that rearrangement in the NCCR changes the transcriptional strength of both the early and late promoters (Gosert *et al.*, 2008; Markowitz *et al.*, 1990; Moens *et al.*, 1995), and the promoter activity of the rearranged NCCR of BKPyV variants isolated from CSF has not been tested so far (Jørgensen *et al.*, 2003; Stoner *et al.*, 2002). All CSF BKPyV isolates in this study had early

**Table 3.** Point mutations identified in the NCCR region of the archetypal and rearranged forms detected in the patients of this study compared to the consensus sequence WW

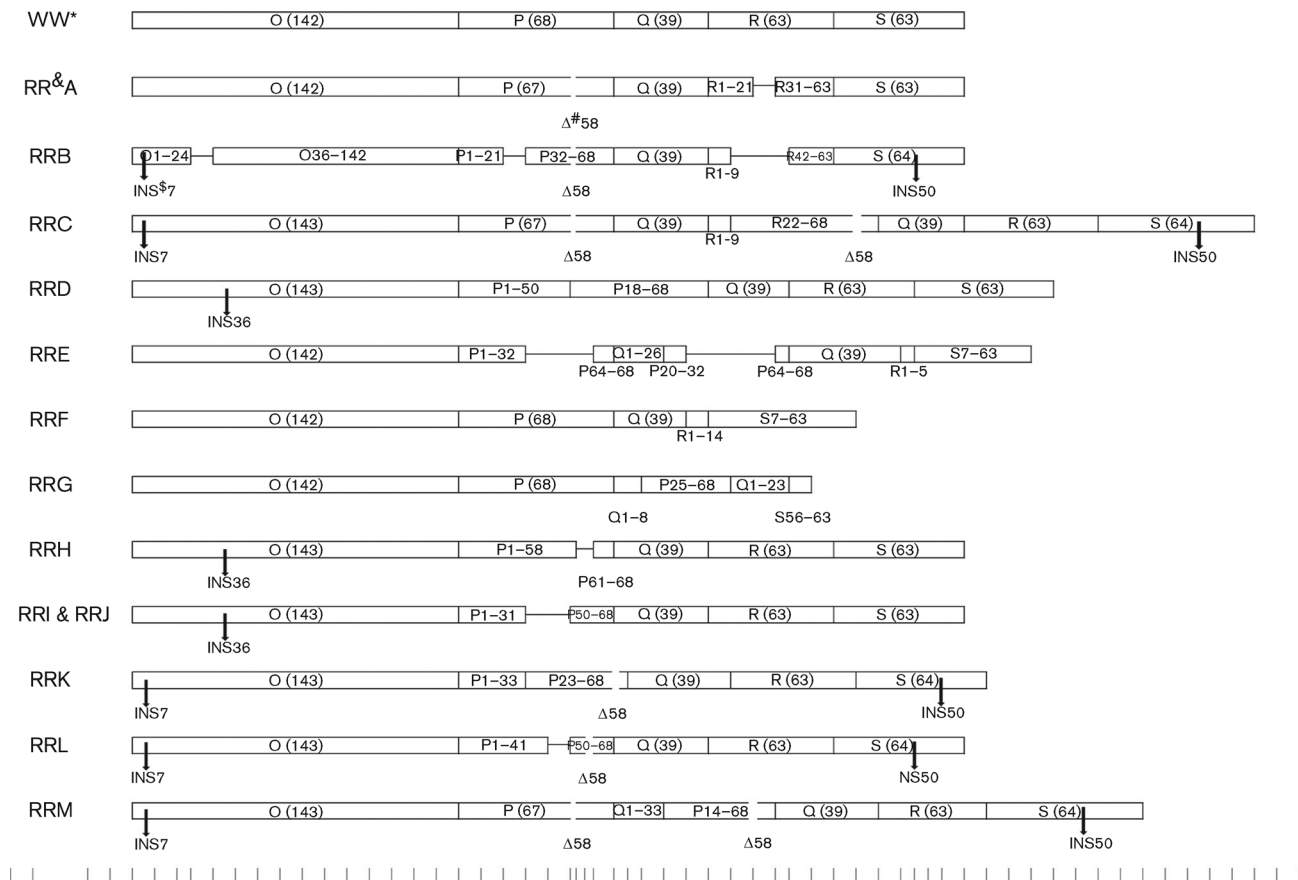
Variant	No. patients		O-block					P-block									
	No. samples	17	A11-T12	G20	C35-A36	WW*M†	G84	A85	A102	T17	A18	A19	A23	T29	T31	G55	A58
WW*M†																	
WWM2	9	9			CCA	WWM2					T				C		
WWM3	16	9	AAT			WWM3					T				C	C	Δ‡
WWM4	1	1				WWM4			G								
WWM5	1	1	ATT			WWM5					T				C		
WWM6	7	4				WWM6											
WWM7	1	1		A		WWM7					T				C		
WWM8	3	2				WWM8					T				C		
WWM9	4	4	AAT			WWM9					T	T			C		
WWM10	1	1				WWM10					T				C		
WWM11	1	1			CCA	WWM11	C	T	C		T				C		
WWM12	1	1				WWM12			C								
WWM13	1	1	AAT			WWM13					T	T			C		
WWM14	2	2	AAT			WWM14	C				T				C	C	Δ <sup>§</sup>
WWM15	1	1				WWM15			C								
WWM16	3	1	AAT			WWM16	C				T				C	C	Δ
WWM17	5	5				WWM17					T				C		
RR\$A	2	1				RR\$A					T				C	C	Δ
RRB	1	1	AAT		ΔA	RRB				A	T	T	Δ		Δ	C	Δ
RRC	1	1	AAT			RRC			G		T				C	C	Δ
RRD	1	1			CCA	RRD			C		T				C		
RRE	2	1				RRE					T				C	Δ	Δ
RRF	2	1				RRF			C								
RRG	1	1				RRG					T				C		
RRH	1	1			CCA	RRH					T						
RRI	1	1			CCA	RRI			C		T				C		
RRJ	1	1			CCA	RRJ			C		T				C		
RRK	1	1	AAT			RRK	C		C		T		G	A	C	C	Δ
RRL	1	1	AAT			RRL			C		T				C	C	Δ
RRM	1	1	AAT			RRM					T				C	C	Δ

\*WW, Archetypal form.  
†WWM, Consensus sequence for WW (Moens & Van Ghelue, 2005).  
‡Δ, Deletion.  
§RR, Rearranged variant.

**Table 3a.**

Variant	Q-block			R-block										S-block					
	C7	C2	G4	A5	A6	T9	C12	C38	G40	G41	C58	C3	G10	A18	T22	A23	G24	C29	A49-A50
WWM2			A		C					T				G			A		ATA
WWM3																			
WWM4																			
WWM5		A	A								T					G		G	
WWM6			A																
WWM7														G					
WWM8	G		A																
WWM9			A	G				G	A						G				ATA
WWM10			A																
WWM11														G					
WWM12			A																
WWM13			A	G		G		G	A						G		A	G	ATA
WWM14			A		C					T		G							ATA
WWM15																			
WWM16			A		C					T				G			A		ATA
WWM17																			ATA
RRSA			A		C					T							A		
RRB			A		C		Δ	Δ	Δ	Δ							A		ATA
RRC			A		C					T							A		ATA
RRD														G					
RRE			A	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	T				A		
RRF								Δ	Δ	Δ	Δ	Δ							
RRG	G	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
RRH																			
RRJ							T							G					
RRK																			
RRL			A		C					T							A	G	ATA
RRM			A		C					T							A		ATA

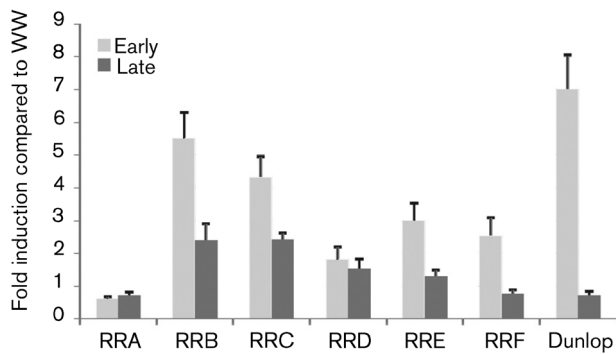




**Fig. 1.** NCCR architecture of the archetypal form and rearranged variants isolated from patients in this study. \*WW, archetypal form; <sup>Δ</sup>RR, rearranged variant; #Δ, deletion; \$INS, insertion.

promoter activities that differed significantly compared to the archetypal early promoter. Except for RRA whose activity was about 60 % of that of the archetypal early promoter, all rearranged variants had stronger early promoter activity than the archetypal. RRA carries a small deletion in the R-block which removes putative binding sites for the transcription factors progesterone receptor A and B, SRY, Nkx2-1, PU.1, GABP, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, FOXN2, STAT1β, ELF-1, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y) and R2 (Table S3). Whether any of these factors bind *in vivo* remains to be established. A functional progesterone responsive element has been identified in the region joining the terminal part of the S-block and the proximal part of the *agnogene* (Moens *et al.*, 1994), but not in the R-block. Deletions in the R-block were also observed in the RRB and RRF variants, but they contain additional deletions in other blocks (Fig. 1). Dunlop had the strongest early promoter activity of the variants tested here. This strain has an NCCR characterized by a triplication of the P-block and complete deletion of the Q- and S-block (OPPPS) (Moens *et al.*, 1995), suggesting that additional P-blocks and/or deletion of Q- and/or R- may strengthen early promoter activity. RRC, RRD and RRE have also additional P-block sequences, but

retain (RRD) or partially or completely duplicate the Q- and R-blocks (RRC and RRE). RRB was the variant that had highest early promoter activity of the BKPyV strains isolated from CSF. Its NCCR consists of the linear OPQRS structure, but with deletions in the O-, P-, and R-blocks. These deletions remove several putative binding sites for transcription factors, but also create new sites for E47 and HSF1 (Table S3). The biological importance of these putative sites remains to be tested. Strains with similar NCCR structure as RRA to RRF have been described by others (Table S1), but only one group tested the promoter activity of these isolates. Gosert and colleagues described several BKPyV isolates in renal transplant patients. Their variant del(R8-18) is almost identical to our RRA variant. While del(R8-18) had ~twofold higher early promoter activity and a late promoter activity that was less than 20 % of that of the archetypal WW strain (Gosert *et al.*, 2008), both early and late promoter activity of our RRA variant with deletion of R22-30 was weaker than WW. One obvious reason could be that deletion of R8-18 removes other putative binding sites or create new sites at the R70R19 junction than the R22-30 deletion (Table S3). Another explanation may be that we used Vero cells, while Gosert and co-workers used HEK293



**Fig. 2.** Early and late promoter activity of the BKPvV variants isolated in CSF. The complete NCCR was cloned in both early and late orientation in the luciferase reporter plasmid pGL3. Vero cells were transfected and luciferase activity was monitored 24 h after transfection and the results show the mean of three independent parallels with SD. Similar results were obtained in two independent experiments. The luciferase activity of the archetypal promoter was arbitrary set as 1.0 and the activities of the other promoters were related to the archetypal NCCR activity. The differences in early (respectively late) promoter activity of each variant tested compared to the early (respectively late) WW promoter activity is statistically significant ( $P < 0.01$ ).

cells. Our RRF carries deletions of R15–63 plus S1–6, while del(13.8) isolated by Gosert *et al.* lacks R4–63 and S1–23. In accordance with their findings, we also found that our RRF had stronger early promoter activity. However, our RRF had comparable late promoter activity with the archetype, whereas del(13.8) presented weaker activity than the archetype. Of the strains with non-linear OPQRS anatomy, RRD resembles ins(4.5), ins(7.3) and ins(1483.5) described by Gosert and colleagues (Gosert *et al.*, 2008). These variants have duplication of P-block nt 16–68, 21–53 and 8–58, respectively, while our RRD variant has duplication of P-block sequences 18–50. All four variants display an early promoter activity that is stronger than WW. However, ins(4.5) and ins(1483.5) had weaker, while ins(7.3) and RRD had stronger late promoter activity compared to WW.

Comparing the promoter activities of the rearranged NCCR from the CSF isolates with the activity of the archetypal NCCR in neuronal cells may reveal whether these rearranged promoters offer a replicative advantage to the virus. However, to our best knowledge, no permissive neuronal cell line for BKPvV has been described yet.

In summary, our findings demonstrate that BKPvV strains with the archetypal OPQRS NCCR anatomy as well as rearranged NCCR can be detected in CSF from neurological patients showing that rearrangements of NCCR per se are not sufficient to create neurotropic strains or to induce neuropathologies. Dissemination of a rearranged variant from the bloodstream to the brain does not seem to have initiated BKPvV infection in the CNS. However, early and late promoter activities of the rearranged neurological

strains generally differed significantly with the archetype and most of them seemed to be stronger than the archetypal promoter. Therefore, because changes in VP1 have also been shown to affect BK replication (Dugan *et al.*, 2007; Tremolada *et al.*, 2010), combination of VP1 polymorphism and rearranged NCCR may favour BKPvV replication in neural tissue.

## METHODS

**Patients and clinical samples.** Between 1998 and 2010, 2406 CSF samples from neurological patients with suspected JCPvV infection were examined for BKPvV, JCPvV and SV40 LT-ag DNA at the National Centre of Microbiology by a qualitative multiplex nested PCR (Fedele *et al.*, 1999). LT-ag BKPvV DNA could be amplified from the CSF of 20 neurological patients, which were further investigated for the presence of BKPvV NCCR DNA. From some of those patients, other samples were available. A total of 27 CSF, 22 sera and one blood specimen from these patients were also analysed (Table 1). The presence of other neurological viruses in the CSF of these 20 patients, such as HSV, varicella-zoster virus, CMV, HHV6, EBV and human enteroviruses (including polio-, echo- and coxsackieviruses) was also determined by nested multiplex PCR (Casas *et al.*, 1997). The VP1 sequences from BKPvV variants in the CSF of 14 of these patients have been described previously (Bárcena-Panero *et al.*, 2012) (Table 1).

In addition, 43 blood and one serum samples from 44 renal transplant recipients and 17 urine, five blood and one serum specimen from six BMT recipients all of them previously positive for BKPvV LT-ag DNA in blood, were tested. Finally, 11 urine samples from 11 healthy pregnant women who were reported to excrete BKPvV DNA in urine were also analysed (Bendixen *et al.*, 2000).

**DNA isolation.** DNA isolation was performed from 200 µl of sample using manual spin columns of QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen). DNA was eluted into a final volume of 20–45 µl nucleases-free water.

**PCR amplification of NCCR sequences.** Amplification of the BKPvV NCCR region was carried out by nested qualitative PCR. Two sets of primers were previously designed. For that purpose, 163 unique BKPvV complete genome sequences belonging to subtypes I–IV were obtained from GenBank and aligned with BioEdit software (Ibis Therapeutics). A first reaction was developed with: ORIBK1 (forward) 5'-ATCTGGGCAAAGAGGAAATCA-3' (nt 4881–4902 in BKPvV Dunlop strain GenBank extension V01108) and ORIBK2 (reverse) 5'-AGCAGCCTCAGATACACTGG-3' (nt 661–680 in BKPvV Dunlop) primers. Nested PCR was performed with ORIBK3 (forward) 5'-CAGGTTCCAAAATCAGGCTG-3' (nt 4924–4943 in Dunlop strain) and ORIBK4 (reverse) 5'-CTAGGAGTCTTTTACAGAGTCT-3' (nt 567–588 in Dunlop strain) primers. MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, primer concentrations, as well as annealing and elongation temperatures were standardized in order to achieve the maximum sensitivity.

For both amplification reactions, AmpliTaq DNA polymerase with GeneAmp kit (Applied Biosystems) including 1.25 U of the polymerase was employed. A final volume of 50 µl was completed with 500 nM of each primer (or 200 nM of the nested reaction primers), 500 µM of dNTPs, 5 mM of MgCl<sub>2</sub> (or 3 mM for the nested PCR), nuclease-free water and 5 µl of the DNA eluted (or 2 µl of the first PCR product for the nested PCR).

Conditions consist of a denaturation of 2 min at 94 °C and 30 cycles of 1 min at 94.9 °C (92 °C for the nested reaction), 1 min at 58.8 °C (58 °C for the nested reaction) and 1 min at 72 °C; and a final elongation step of 5 min at 72 °C.

Ten microlitres of each PCR sample was electrophoresed in a 1% agarose gel prestained with ethidium bromide and visualized with UV fluorescence.

In all PCR experiments, positive (one BKPyV-positive urine sample) and negative controls (water) were included. To avoid contamination, ultrapure reagents were added under a laminar flow hood and different rooms, reagents and equipment were used for the DNA isolation, PCR set up and analysis.

**Sequencing of the nested PCR product.** Amplified products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Sequencing of both strands was carried out with the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready kit (Applied Biosystems) and 1 µM of the nested primers. PCR conditions consisted of 3 min at 94 °C and 25 cycles of 10 s at 96 °C, 5 s at 50 °C and 4 min at 60 °C. Sequencing reactions were analysed on an ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems).

**Analysis of BKPyV NCCR sequences.** Resulting sequences were aligned with the DNASTAR software v6 (Lasergene; DNASTAR Inc.) and compared to the reference strain WW (Moens & Van Ghelue, 2005) with BioEdit software (Ibis Therapeutics). To identify those sequences in the alignment that were unique, DnaSP v5 software (Librado & Rozas, 2009) was used.

**Construction of luciferase reporter plasmid with the rearranged NCCR from the CSF BKPyV isolates.** The complete NCCRs of the six rearranged neurological BKPyV variants RRA, RRB, RRC, RRD, RRE, RRF and the archetypal form, WWM (obtained from the CSF of neurological patients NP5, NP7, NP11, NP12, NP17, NP20 and NP9, respectively) were amplified. PCR was performed in a volume of 30 µl using 150 ng of the primers that included *Hind*III restriction sites: NCCR F 5'-CTAAGCTTTTGCAAAATTGCA-AAAGAATAGG-3' (nt 1–26 in Dunlop strain) and NCCR R 5'-GT-AAGCTTGGCCTTTGTCCAGTTAACTG-3' (nt 367–387 in Dunlop strain). Reaction mix was completed with 15 µl Jumpstart (Sigma-Aldrich), 2 µl of the PCR product resulting from the amplification of the corresponding CSF samples with ORIBK1 and ORIBK2 primers that was employed as template and nuclease-free water. PCR conditions used were 5 min at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C; and 7 min at 72 °C. PCR products were purified from the gel with a NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel) and cloned into a TOPO TA cloning kit with PCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen). Resulting plasmids were purified using a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) and the presence of the inserts was confirmed by sequencing. The resulting plasmids were cleaved with *Hind*III (New England Biolabs) and ligated to the pGL3-basic vector containing the firefly *luciferase* gene (Promega) that was previously digested with *Hind*III and dephosphorylated with calf intestinal alkaline phosphatase (New England Biolabs). Ligation products were used to transform competent cells (*Escherichia coli* DH5α). Resulting plasmids were purified as described above and the presence of the insert was confirmed by sequencing. Recombinant plasmids with inserts in both orientations were chosen in order to test the activity of both early and late NCCR promoters. DNA of positive constructs was purified by the NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel). Construction of the luciferase reporter plasmid with the early and late promoters of the Dunlop strain has been described previously (Johannessen *et al.*, 2008).

**Transfection of Vero cells.** Vero African green monkey kidney cells (ATCC CCL-81) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) with 10% FBS (Invitrogen). Cells at approximately 60–70% confluence in six-well plates were transfected with 4 µg of either pGL3-basic vector or the vector containing NCCR sequences. Transfection was carried out with 10 µl Lipofectamine

2000 (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Medium was replaced after 4 h. Each experiment was repeated three times with three independent parallels.

**Luciferase assays.** Cells were lysed approximately 24 h post-transfection by using the Luciferase Assay Tropic Lysis solution (Applied Biosystems) as the manufacturer's instructions. Luciferase activity of each of the recombinant plasmids and the pGL3 basic control plasmid was calculated by the number of light units measured by a luminometer (Labsystem Luminoscan RT).

**Statistical analysis.** The statistical significance of the frequency of the rearrangements in the CSF of neurological patients regarding to other groups of patients was calculated with the Chi-squared test. Moreover, *t*-test was employed to determine statistical differences between the activity of the early and late promoters of each of the rearranged variants compared to the WW form.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by Biogen Idec Iberia, Madrid, Spain and the Mohn Foundation (Tromsø Forskningsstiftelse A20242). The authors would like to thank Olga Shiryayeva for her advices with the statistical analysis.

## REFERENCES

- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A., Dalianis, T., Ramqvist, T. & Andersson, B. (2007). Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* **81**, 4130–4136.
- Anzivino, E., Bellizzi, A., Mitterhofer, A. P., Tinti, F., Barile, M., Colosimo, M. T., Fioriti, D., Mischitelli, M., Chiarini, F. & other authors (2011). Early monitoring of the human polyomavirus BK replication and sequencing analysis in a cohort of adult kidney transplant patients treated with basiliximab. *Virol J* **8**, 407.
- Arthur, R. R., Dagostin, S. & Shah, K. V. (1989). Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **27**, 1174–1179.
- Bárcena-Panero, A., Van Ghelue, M., Khan, M. T., Echevarría, J. E., Fedele, G. & Moens, U. (2012). BK virus-associated infection in cerebrospinal fluid of neurological patients and mutation analysis of the complete VP1 gene in different patient groups. *J Cell Physiol* **227**, 136–145.
- Behre, G., Becker, M. & Christopheit, M. (2008). BK virus encephalitis in an allogeneic hematopoietic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant* **42**, 499.
- Behzad-Behbahani, A., Klapper, P. E., Valley, P. J. & Cleator, G. M. (2003a). BK virus DNA in CSF of immunocompetent and immunocompromised patients. *Arch Dis Child* **88**, 174–175.
- Behzad-Behbahani, A., Klapper, P. E., Valley, P. J., Cleator, G. M. & Bonington, A. (2003b). BKV-DNA and JCV-DNA in CSF of patients with suspected meningitis or encephalitis. *Infection* **31**, 374–378.
- Bendiksen, S., Rekvig, O. P., Van Ghelue, M. & Moens, U. (2000). VP1 DNA sequences of JC and BK viruses detected in urine of systemic lupus erythematosus patients reveal no differences from strains expressed in normal individuals. *J Gen Virol* **81**, 2625–2633.
- Bhattacharjee, S. & Chakraborty, T. (2004). High reactivation of BK virus variants in Asian Indians with renal disorders and during pregnancy. *Virus Genes* **28**, 157–168.
- Bofill-Mas, S., Pina, S. & Girones, R. (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by



studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* **66**, 238–245.

**Boldorini, R., Veggiani, C., Turello, E., Barco, D. & Monga, G. (2005).** Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol* **124**, 303–312.

**Boldorini, R., Allegrini, S., Miglio, U., Paganotti, A. & Veggiani, C. (2009).** Detection, distribution, and pathologic significance of BK virus strains isolated from patients with kidney transplants, with and without polyomavirus-associated nephropathy. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 766–774.

**Boldorini, R., Allegrini, S., Miglio, U., Paganotti, A., Cocca, N., Zaffaroni, M., Riboni, F., Monga, G. & Viscidi, R. (2011).** Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J Gen Virol* **92**, 1044–1050.

**Bratt, G., Hammarin, A. L., Grandien, M., Hedquist, B. G., Nennesmo, I., Sundelin, B. & Seregarde, S. (1999).** BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* **13**, 1071–1075.

**Broekema, N. M., Abend, J. R., Bennett, S. M., Butel, J. S., Vanchiere, J. A. & Imperiale, M. J. (2010).** A system for the analysis of BKV non-coding control regions: application to clinical isolates from an HIV/AIDS patient. *Virology* **407**, 368–373.

**Cabrejo, L., Diop, M., Blohorn-Sense, A. & Mihout, B. (2005).** [Progressive BK virus associated multifocal leukoencephalopathy in an immunocompromised patient treated with corticosteroids]. *Rev Neurol (Paris)* **161**, 326–330.

**Carr, M. J., McCormack, G. P., Mutton, K. J. & Crowley, B. (2006).** Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol* **78**, 485–493.

**Casas, I., Tenorio, A., Echevarría, J. M., Klapper, P. E. & Cleator, G. M. (1997).** Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* **66**, 39–50.

**Chang, D., Wang, M., Ou, W. C., Lee, M. S., Ho, H. N. & Tsai, R. T. (1996).** Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol* **48**, 95–101.

**De Mattei, M., Martini, F., Corallini, A., Gerosa, M., Scotlandi, K., Carinci, P., Barbanti-Brodano, G. & Tognon, M. (1995).** High incidence of BK virus large-T-antigen-coding sequences in normal human tissues and tumors of different histotypes. *Int J Cancer* **61**, 756–760.

**Dörries, K., Vogel, E., Günther, S. & Czub, S. (1994).** Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* **198**, 59–70.

**Dugan, A. S., Gasparovic, M. L., Tsomaia, N., Mierke, D. F., O'Hara, B. A., Manley, K. & Atwood, W. J. (2007).** Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* **81**, 11798–11808.

**Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., Gosert, R. & Hirsch, H. H. (2009).** Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* **199**, 837–846.

**Elsner, C. & Dörries, K. (1992).** Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology* **191**, 72–80.

**Fedele, C. G., Ciardi, M., Delia, S., Echevarria, J. M. & Tenorio, A. (1999).** Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods* **82**, 137–144.

**Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. & Moore, P. S. (2008).** Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**, 1096–1100.

**Ferrari, A., Luppi, M., Marasca, R., Potenza, L., Morselli, M., Volzone, F., Santachiara, R., Forghieri, F., Barozzi, P. & Torelli, G. (2008).** BK virus infection and neurologic dysfunctions in a patient with lymphoma treated with chemotherapy and rituximab. *Eur J Haematol* **81**, 244–245.

**Flaegstad, T., Sundsfjord, A., Arthur, R. R., Pedersen, M., Traavik, T. & Subramani, S. (1991).** Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology* **180**, 553–560.

**Friedman, D. P. & Flanders, A. E. (2006).** MR imaging of BK virus encephalitis. *AJNR Am J Neuroradiol* **27**, 1016–1018.

**Garavelli, P. L. & Boldorini, R. (2002).** [BK virus encephalitis in an HIV-seropositive patient. Preliminary data]. *Recenti Prog Med* **93**, 247.

**Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P. & Wang, D. (2007).** Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* **3**, e64.

**Gosert, R., Rinaldo, C. H., Funk, G. A., Egli, A., Ramos, E., Drachenberg, C. B. & Hirsch, H. H. (2008).** Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* **205**, 841–852.

**Hammarin, A. L., Bogdanovic, G., Svedhem, V., Pirskanen, R., Morfeldt, L. & Grandien, M. (1996).** Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* **34**, 2929–2932.

**Hedquist, B. G., Bratt, G., Hammarin, A. L., Grandien, M., Nennesmo, I., Sundelin, B. & Seregard, S. (1999).** Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* **106**, 129–132.

**Hirsch, H. H. & Steiger, J. (2003).** Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* **3**, 611–623.

**Hix, J. K., Braun, W. E. & Isada, C. M. (2004).** Delirium in a renal transplant recipient associated with BK virus in the cerebrospinal fluid. *Transplantation* **78**, 1407–1408.

**Johannessen, M., Myhre, M. R., Dragset, M., Tümmeler, C. & Moens, U. (2008).** Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulatory function. *Virology* **379**, 97–109.

**Jørgensen, G. E., Hammarin, A. L., Bratt, G., Grandien, M., Flaegstad, T. & Johnsen, J. I. (2003).** Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol* **70**, 14–19.

**Kean, J. M., Rao, S., Wang, M. & Garcea, R. L. (2009).** Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* **5**, e1000363.

**Kinnaird, A. N. & Anstead, G. M. (2010).** Hemorrhagic cystitis and possible neurologic disease from BK virus infection in a patient with AIDS. *Infection* **38**, 124–127.

**Lesprit, P., Chaline-Lehmann, D., Authier, F. J., Ponnelle, T., Gray, F. & Levy, Y. (2001).** BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *AIDS* **15**, 1196–1199.

**Librado, P. & Rozas, J. (2009).** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.

**Lopes da Silva, R. (2011a).** BK virus neurotropism. *J Infect Public Health* **4**, 103–104.

**Lopes da Silva, R. (2011b).** Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *Braz J Infect Dis* **15**, 276–284.

- Lopes da Silva, R., Ferreira, I., Teixeira, G., Cordeiro, D., Mafra, M., Costa, I., Bravo Marques, J. M. & Abecasis, M. (2011). BK virus encephalitis with thrombotic microangiopathy in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 13, 161–167.
- Markowitz, R. B. & Dynan, W. S. (1988). Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *J Virol* 62, 3388–3398.
- Markowitz, R. B., Tolbert, S. & Dynan, W. S. (1990). Promoter evolution in BK virus: functional elements are created at sequence junctions. *J Virol* 64, 2411–2415.
- Markowitz, R. B., Eaton, B. A., Kubik, M. F., Latorra, D., McGregor, J. A. & Dynan, W. S. (1991). BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65, 4515–4519.
- Marshall, L. J. & Major, E. O. (2010). Molecular regulation of JC virus tropism: insights into potential therapeutic targets for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmune Pharmacol* 5, 404–417.
- Moens, U. & Johannessen, M. (2008). Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. *J Dtsch Dermatol Ges* 6, 704–708.
- Moens, U. & Van Ghelue, M. (2005). Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology* 331, 209–231.
- Moens, U., Subramaniam, N., Johansen, B., Johansen, T. & Traavik, T. (1994). A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol* 68, 2398–2408.
- Moens, U., Johansen, T., Johnsen, J. I., Seternes, O. M. & Traavik, T. (1995). Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* 10, 261–275.
- Olsen, G. H., Andresen, P. A., Hilmarsen, H. T., Bjørang, O., Scott, H., Midtvedt, K. & Rinaldo, C. H. (2006). Genetic variability in BK virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol* 78, 384–393.
- Padgett, B. L., Zurhein, G. M., Walker, D. L., Eckroade, R. J. & Dessel, B. H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257–1260.
- Pfister, L. A., Letvin, N. L. & Koralnik, I. J. (2001). JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 75, 5672–5676.
- Randhawa, P., Zygmunt, D., Shapiro, R., Vats, A., Weck, K., Swalsky, P. & Finkelstein, S. (2003). Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int* 64, 743–747.
- Replogel, M. D., Storch, G. A. & Clifford, D. B. (2001). BK virus: a clinical review. *Clin Infect Dis* 33, 191–202.
- Ribeiro, T., Fleury, M. J., Granieri, E., Castellazzi, M., Martini, F., Mazzoni, E., Coursaget, P. & Tognon, M. (2010). Investigation of the prevalence of antibodies against neurotropic polyomaviruses BK, JC and SV40 in sera from patients affected by multiple sclerosis. *Neurol Sci* 31, 517–521.
- Rubinstein, R. & Harley, E. H. (1989). BK virus DNA cloned directly from human urine confirms an archetypal structure for the transcriptional control region. *Virus Genes* 2, 157–165.
- Rubinstein, R., Schoonakker, B. C. & Harley, E. H. (1991). Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *J Virol* 65, 1600–1604.
- Ryschkewitsch, C., Jensen, P., Hou, J., Fahle, G., Fischer, S. & Major, E. O. (2004). Comparison of PCR-Southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* 121, 217–221.
- Sabath, B. F. & Major, E. O. (2002). Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 186 (Suppl. 2), S180–S186.
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K. A., Moyer, A. L. & Buck, C. B. (2010). Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7, 509–515.
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H. & Ehlers, B. (2011). A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 85, 4586–4590.
- Seif, I., Khoury, G. & Dhar, R. (1979). The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18, 963–977.
- Sharma, P. M., Gupta, G., Vats, A., Shapiro, R. & Randhawa, P. S. (2007). Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol* 79, 1199–1207.
- Stoner, G. L., Alappan, R., Jobes, D. V., Ryschkewitsch, C. F. & Landry, M. L. (2002). BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am J Kidney Dis* 39, 1102–1112.
- Sugimoto, C., Hara, K., Taguchi, F. & Yogo, Y. (1989). Growth efficiency of naturally occurring BK virus variants in vivo and in vitro. *J Virol* 63, 3195–3199.
- Sundsford, A., Johansen, T., Flaegstad, T., Moens, U., Villand, P., Subramani, S. & Traavik, T. (1990). At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J Virol* 64, 3864–3871.
- Sundsford, A., Spein, A. R., Lucht, E., Flaegstad, T., Seternes, O. M. & Traavik, T. (1994). Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol* 32, 1390–1394.
- Sundsford, A., Osei, A., Rosenqvist, H., Van Ghelue, M., Silsand, Y., Haga, H. J., Rekvig, O. P. & Moens, U. (1999). BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viremia, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis* 180, 1–9.
- Tornatore, C., Berger, J. R., Houff, S. A., Curfman, B., Meyers, K., Winfield, D. & Major, E. O. (1992). Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 31, 454–462.
- Tremolada, S., Delbue, S., Larocca, S., Carloni, C., Elia, F., Khalili, K., Gordon, J. & Ferrante, P. (2010). Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus Res* 149, 190–196.
- Vago, L., Cinque, P., Sala, E., Nebuloni, M., Caldarelli, R., Racca, S., Ferrante, P., Trabottoni, G. & Costanzi, G. (1996). JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12, 139–146.
- Vallbracht, A., Löhler, J., Gossmann, J., Glück, T., Petersen, D., Gerth, H. J., Gencic, M. & Dörries, K. (1993). Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol* 143, 29–39.
- van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J. N., Gorbelenya, A. E. & Feltkamp, M. C. (2010). Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromised patient. *PLoS Pathog* 6, e1001024.

**Vidal, J. E., Fink, M. C., Cedeno-Laurent, F., Delbue, S., Ferrante, P., Dauar, R. F., Filho, F. B., Nogueira, R. S., Calore, E. E. & other authors (2007).** BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. *AIDS Res Ther* **4**, 13.

**Voltz, R., Jäger, G., Seelos, K., Fuhry, L. & Hohlfeld, R. (1996).** BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol* **53**, 101–103.

**White, M. K. & Khalili, K. (2011).** Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy–revisited. *J Infect Dis* **203**, 578–586.

**Zhong, S., Zheng, H. Y., Suzuki, M., Chen, Q., Ikegaya, H., Aoki, N., Usuku, S., Kobayashi, N., Nukuzuma, S. & other authors (2007).** Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmuno-compromised individuals. *J Clin Microbiol* **45**, 193–198.

**TABLE 5.S1.** Previous reported BKPyV strains with similar NCCR anatomy to those described in this study.

	NCCR anatomy	Previous reported strains with similar anatomy	Specimen	Reference/accession number
<b>Strain with linear OPQRS NCCR*</b>				
RR <sup>†</sup> A	<b>OPQR(Δ)S<sup>#</sup></b>	case 1, case 5, del(R8-18), DDP, PBMC-9a, PBMC-30b, PBMC-33, PQ, RH-15, SEC-21, TCH2	fetal brain and kidney, placenta, PBMC <sup>‡</sup> from healthy and HIV positive individuals, urine, blood, plasma and kidney biopsy from renal transplant patients, urine AIDS patient, urine non-immunocompromised individuals	[Boldorini et al., 2005b; Broekema et al., 2010; Degener et al., 1999; Gosert et al., 2008; Olsen et al., 2006; Pietropaolo et al., 1998a; Yogo et al., 2008b]
RRB	<b>O(Δ)P(Δ)QR(Δ)S</b>	cl-108 G7RBK, Seq 3, T4R3.BK cl3, WW	urinary cells from a FSGS <sup>£</sup> patient, urine renal transplant patients, kidney patient with CLL <sup>&amp;</sup> and fatal case of BKPyV tubulointestinal nephritis	[Li et al., 2002; Stoner et al., 2002; Sugimoto et al., 1989; Takasaka et al., 2004]
RRF	<b>OPQR(Δ)S(Δ)</b>	del(3.2), del(13.8), JL, RH-9, TCH1	urine and plasma renal transplant patients, urine AIDS patient	[Broekema et al., 2010; Gosert et al., 2008; Olsen et al., 2006; Vera-Sempere et al., 2006; Vera-Sempere et al., 2005]
RRH, RRI, RRJ, RRL	<b>OP(Δ)QRS</b>	A191-2, C-3, case 2, D(v5), E-2(v8), HI-u8, RH-1, RH-19, Seq10, SJH85B, T3R2.BK, T2M.2BK, V128-1, V173-1, WWT2	urine, blood, and kidney biopsies of renal transplant patients, urine HIV-2 positive patient, urine bone marrow transplant patient, fetal liver and kidney, urine hematopoietic stem cell transplant recipients	[Boldorini et al., 2010; Boldorini et al., 2009a; Boldorini et al., 2005b; Carr et al., 2006; Chen et al., 2004; Flaegstad et al., 1991; Li et al., 2002; Moens and Van Ghelue, 2005; Olsen et al., 2006; Perets et al., 2009; Takasaka et al., 2004]
<b>Strain with rearranged NCCR</b>				
RRC	<b>OPQRPQRS</b>	case 5, TU	urine renal transplant patients, urine children	[Boldorini et al., 2005b; Sundsfjord et al., 1990]
RRD, RRK	<b>OPPQRS</b>	B (v2), BMT-14, C (v5), cl-51, cl-54, cl-59, cl-97, ins(4.5), ins(7.3), ins(P24-37), ins(1483.5), Seq6, TCH3, TCH4	urine bone marrow transplant patient, urine AIDS patient, urine SLE <sup>§</sup> patient, urine and plasma renal transplant patients	[Broekema et al., 2010; Gosert et al., 2008; Negrini et al., 1991; Perets et al., 2009; Sugimoto et al., 1989; Takasaka et al., 2004]
RRE, RRM	<b>OPQRPQRS</b>	A-2(v3 and v4), B (v1 and v4), C (v2 and v4), D (v1,v2, and v6), E-1 (v1, v2, and v15), E-2 (v1), E-3 (v1 and v10), case 2, case 5, MMR-6, SJH16A, SJH18A, SJH85A, TC-3, TCH5	blood, urine, and plasma from renal transplant patients, urine AIDS patient, urine hematopoietic stem cell transplant recipients, kidney renal transplant patient, urine non-immunocompromised individuals	[Boldorini et al., 2005b; Broekema et al., 2010; Carr et al., 2006; Chen et al., 2001; Perets et al., 2009; Yogo et al., 2008b]
RRG	<b>OPQPQS</b>	BK-OV1,C-2 (v6), C-3 (v6), NP132, PBMC-7, T4R4.BK, BKV (Yale)	ovarian cancer, NPA <sup>@</sup> from children with respiratory disease, PBMC healthy individuals, urine and plasma from renal transplant patients, kidney patient with CLL and fatal case of BKPyV tubulointestinal nephritis	[Chatterjee et al., 2000; Li et al., 2002; Perets et al., 2009; Stoner et al., 2002; Sundsfjord et al., 1994]; AY573928

\* NCCR: non coding control region.

<sup>†</sup> RR: rearranged forms detected in this study.<sup>#</sup> R(Δ) indicates partial or complete deletion of the R- block.<sup>‡</sup> PBMC: peripheral blood mononuclear cells.<sup>£</sup> FSGS: focal segmental glomerulosclerosis.<sup>&</sup> CLL:chronic lymphocyte leukemia.<sup>§</sup> SLE: systemic lupus erythematosus.<sup>@</sup> NPA: nasopharyngeal aspirates.

**TABLE 5.S2.** Putative transcription factor binding sites in the transcriptional control region of NCCR WW (PQRS)

Location in NCCR	Transcription factor	Sequence
P2-10	BTEB3	ACAGGGAGG
P3-8	R2	CAGGGA
P3-9	EIIaE-A	CAGGGAG
P3-14	NERF-1a	CAGGGAGGAGCT
P4-10	Nkx2-1	AGGGAGG
P5-13	BTEB3	GGGAGGAGC
P5-15	FOXN2	GGGAGGAGCTG
P6-10	Elk-1	GGAGG
P6-10	p300	GGAGG
P6-11	R2	GGAGGA
P9-13	Elk-1	GGAGC
P9-13	p300	GGAGC
P16-22	AP-3	CTAACCC
P19-22	VDR	ACCC
P21-27	YY1	CCATGCA
P22-28	C/EBP $\beta$	CATGCAA
P23-30	POU2F2C	ATGCAATG
P23-28	C/EBP $\alpha$	ATGCAA
P23-33	octamer-binding factor	ATGCAATGCAG
P24-29	CUTL1	TGCAAT
P27-35	GCMa	AATGCAGCC
P29-36	ENKTF-1	TGCAGCCA
P33-37	NF1	GCCAA
P33-42	AIRE	GCCAAACCAT
P34-41	NFI/CTF	CCAAACCA
P36-47	T3R $\alpha$	AAACCATGACCT
P38-45	USF2b	ACCATGAC
P38-49	CREM $\alpha$	ACCATGACCTCA
P39-45	Pax2	CCATGAC
P39-45	YY1	CCATGAC
P39-49	T3R $\beta$ 1	CCATGACCTCA
P40-52	ERR $\alpha$ 1	CATGACCTCAGGA
P41-46	LCR-F1	ATGACC
P41-48	c-FOS	ATGACCTC
P41-48	ER $\alpha$	ATGACCTC
P41-50	RAR $\alpha$ 1	ATGACCTCAG
P41-51	SF-1	ATGACCTCAGG
P42-48	c-JUN	TGACCTC
P42-48	NHP-1	TGACCTC
P42-49	RAR $\beta$	TGACCTCA
P42-50	ARP-1	TGACCTCAG
P42-50	RXR $\alpha$	TGACCTCAG
P42-50	ER $\beta$	TGACCTCAG
P42-50	COUP-TF1	TGACCTCAG
P42-51	ROR $\alpha$ 1	TGACCTCAGG
P42-52	T3R $\alpha$ 1	TGACCTCAGGA
P44-51	TFIIB	ACCTCAGG



Location in NCCR	Transcription factor	Sequence
P45-51	Nkx2-1	CCTCAGG
P48-59	NERF-1a	CAGGAAGGAAAG
P48-54	c-Ets-1	CAGGAAG
P49-56	c-Ets-2	AGGAAGGA
P50-53	STAT5A	GGAA
P50-54	Elk-1	GGAAG
P50-54	p300	GGAAG
P50-55	STAT4	GGAAGG
P50-56	HMG I(Y)	GGAAGGA
P50-58	IRF-1	GGAAGGAAA
P50-59	STAT1 $\beta$	GGAAGGAAAG
P51-56	R2	GAAGGA
P52-58	c-Ets-1	AAGGAAA
P53-60	c-Ets-2	AGGAAAGT
P54-57	STAT5A	GGAA
P54-58	Elk-1	GGAAA
P54-58	p300	GGAAA
P54-59	STAT4	GGAAAG
P54-60	IRF-3	GGAAAGT
P54-60	HMG I(Y)	GGAAAGT
P54-62	NF-AT1	GGAAAGTGC
P54-62	NF-AT2	GGAAAGTGC
P54-64	NF $\kappa$ B	GGAAAGTGCAT
P57-64	POU2F2C	AAGTGCAT
P57-65	SXR:RXR $\alpha$	AAGTGCATG
P60-67	USF2b	TGCATGAC
P61-67	Pax2	GCATGAC
P63-68	LCR-F1	ATGACT
P63-Q2	c-FOS	ATGACTGG
P64-Q2	c-JUN	TGACTGG
P64-Q3	API	TGACTGGG
P65-Q3	E47	GACTGGG
P67-Q5	ElkA-E-A	CTGGGCA
P67-Q5	LF-A1	CTGGGCA
Q1-7	p53	GGGCAGC
Q2-9	ENKTF-1	GGCAGCCA
Q6-12	E47	GCCAGCC
Q6-13	ENKTF-1	GCCAGCCA
Q10-16	E47	GCCAGTG
Q13-19	LF-A1	AGTGGCA
Q15-22	ENKTF-1	TGGCAGTT
Q16-23	c-MYB	GGCAGTTA
Q20-27	HNF-1A	GTTAATAG
Q21-31	Pax-6	TTAATAGTGAA
Q22-29	HNF-1B	TAATAGTG
Q31-R2	GCF	AACCCCGCCCC
Q32-R1	E2F-1:DP-1	ACCCCGCCC
Q32-35	VDR	ACCC
Q33-39	E2F-1	CCCCGC

Location in NCCR	Transcription factor	Sequence
Q33-R2	ETF	CCCCGCCCC
Q33-R2	Sp3	CCCCGCCCC
Q34-R1	p53	CCCGCCC
Q34-R3	Sp1	CCCGCCCCT
Q36-R3	ElIaE-A	CGCCCCCT
Q37-R8	EBF	GCCCCTGAAAT
R5-11	POU3F2	AAATTCT
R9-16	POU2F2 (Oct2.1)	TCTCAAAT
R9-18	HNF-3 $\alpha$	TCTCAAATAA
R12-21	FOXJ2	CAAATAAACA
R13-19	POU3F2	AAATAAA
R15-22	GR $\alpha$	ATAAACAC
R16-22	HNF-3 $\beta$	TAAACAC
R17-23	PRA/B	AAACACA
R19-25	SRY	ACACAAG
R22-28	Nkx2-1	CAAGAGG
R22-34	ELF-1	CAAGAGGAAGTGG
R23-33	FOXN2	AAGAGGAAGTG
R23-34	GABP $\alpha$	AAGAGGAAGTGG
R24-35	GABP	AGAGGAAGTGGA
R25-31	c-Ets-1	GAGGAAG
R25-34	PU.1	GAGGAAGTGG
R26-33	c-Ets-2	AGGAAGTG
R27-30	STAT5A	GGAA
R27-31	Elk-1	GGAAG
R27-31	p300	GGAAG
R27-32	STAT4	GGAAGT
R27-33	HMG I(Y)	GGAAGTG
R29-37	IRF-1	AAGTGGA
R29-38	STAT1 $\beta$	AAGTGGAAC
R30-35	R2	AGTGGA
R31-37	c-Ets-1	GTGGA
R33-36	STAT5A	GGAA
R33-37	Elk-1	GGAA
R33-37	p300	GGAA
R33-38	STAT4	GGAAAC
R33-39	IRF-3	GGAAACT
R33-39	HMG I(Y)	GGAAACT
R33-41	NF-AT2	GGAAACTGG
R33-41	NF-AT1	GGAAACTGG
R35-42	c-MYB	AAACTGGC
R36-42	E47	AACTGGC
R37-44	ENKTF-1	ACTGGCCA
R39-46	ENKTF-1	TGGCCAAA
R39-47	TCF-1A	TGGCCAAAG
R40-47	LEF-1	GGCCAAAG
R41-45	NF1	GCCAA
R41-47	TCF-4E	GCCAAAG
R42-49	NFI/CTF	CCAAAGGA

Location in NCCR	Transcription factor	Sequence
R43-51	BTEB3	CAAAGGAGT
R47-51	Elk-1	GGAGT
R47-51	p300	GGAGT
R48-56	IRF-1	GAGTGGAAA
R48-57	STAT1 $\beta$	GAGTGGAAAAG
R49-54	R2	AGTGGGA
R50-56	c-Ets-1	GTGGAAA
R52-55	STAT5A	GGAA
R52-56	Elk-1	GGAAA
R52-56	p300	GGAAA
R52-57	STAT4	GGAAAG
R52-58	IRF-3	GGAAAGC
R52-58	HMG I(Y)	GGAAAGC
R52-59	NF-AT1	GGAAAGCA
R52-60	NF-AT2	GGAAAGCAG
R52-60	NF-AT1	GGAAAGCAG
R56-63	ENKTF-1	AGCAGCCA
R58-S4	Smad3/4	CAGCCAGACA
R60-S3	E47	GCCAGAC
R62-S8	Smad3/4	CAGACAGACA
S4-10	NHP-1	AGACATG
S7-13	PRA/B	CATGTTT
S8-15	GR $\alpha$	ATGTTTTG
S9-16	GR $\beta$	TGTTTTGC
S13-18	C/EBP $\alpha$	TTGCGA
S13-19	C/EBP $\beta$	TTGCGAG
S19-24	AP-2 $\alpha$ A	GCCTAG
S21-28	HSF	CTAGGAAT
S22-28	c-Ets-1	TAGGAAT
S23-20	c-Ets-2	AGGAATCT
S24-27	STAT5A	GGAA
S24-28	Elk-1	GGAAT
S24-28	p300	GGAAT
S24-29	STAT4	GGAATC
S24-30	HMG I(Y)	GGAATCT
S26-33	NFI/CTF	AATCTTGG
S30-34	NF1	TTGGC
S31-38	ENKTF-1	TGGCCTTG
S33-38	AP-2 $\alpha$ A	GCCTTG
S35-41	SRY	CTTGTCC
S37-41	Elk-1	TGTCC
S37-41	p300	TGTCC
S38-49	ANF	GTCCCCAGTTAA
S39-44	R2	TCCCCA
S39-45	MZF-1	TCCCCAG
S41-47	E47	CCCAGTT
S41-48	c-MYB	CCCAGTTA
S45-52	HNF-1A	GTTAAACT

Location in NCCR	Transcription factor	Sequence
S47-53	HNF-3 $\beta$	TAAACTG
S47-58	ANF	TAAACTGGACAA
S48-55	c-MYB	AAACTGGA
S49-55	E47	AACTGGA
S50-55	R2	ACTGGA
S52-60	TCF-1A	TGGACAAAG
S53-57	Elk-1	GGACA
S53-57	p300	GGACA
S53-59	SRY	GGACAAA
S53-60	LEF-1	GGACAAAG
S54-60	TCF-4E	GACAAAG
S57-62	AP-2 $\alpha$ A	AAAGGC

**TABLE 5.S3.** Removal or creation of putative transcription factor binding sites due to rearrangements of the P, Q, R, and S blocks.

NCCR variant*	Rearrangement	TF sites removed	TF sites created <sup>§</sup>
<b>RR<sup>†</sup>A</b>	deletion R22-30	PRA/B, SRY, Nkx2-1, PU.1, GABP, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, FOXN2, STAT1 $\beta$ , ELF-1, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2	HNF3 $\beta$ , GR $\alpha$ , PRA, PRB (at new R junction created by deletion)
<b>RRB</b>	deletion P22-31	C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , POU2F2C, octamer binding factor, CUTL1, GCMA, ENKTF-1	E47 (at new P junction created by deletion)
	deletion R10-41	POU3F2, POU2F2 (Oct2.1), HNF-3 $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ , FOXJ2, POU3F2, GR $\alpha$ , PRA/B, SRY, Nkx2-1, PU.1, GABP, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, FOXN2, STAT1 $\beta$ , ELF-1, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, c-MYB, E47, ENKTF-1, TCF-1A, LEF-1, NF1, TCF-4E	HSF1 (at new R junction created by deletion)
<b>RRC</b>	duplication R1-9		Sp1 (at Q-R junction)
	duplication P22-68		C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , POU2F2C, octamer binding factor, CUTL1, GCMA, ENKTF-1, NF1, AIRE, NFI/CTF, T3R $\alpha$ , T3R $\beta$ , USF2b, CREM $\alpha$ , Pax2, YY1, ERR $\alpha$ 1, LCR-F1, c-FOS, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , RAR $\alpha$ 1, SF-1, c-JUN, NHP1, RAR $\beta$ , ARP-1, RXR $\alpha$ , COUP-TF, ROR $\alpha$ 1, TFIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1 $\beta$ , Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NF $\kappa$ B, SXR:RXR $\alpha$ , LCR-F1
	duplication Q		p53, ENKTF-1, E47, LF-A1, c-MYB, HNF-1A, Pax6, HNF-1B, GCF, E2F:DP-1, VDR, E2F-1 (duplication of complete Q block)  HNF-1B, Cart-1, POU3F2, C/EBP $\beta$ , POU6F1 (at R-P junction)

NCCR variant*	Rearrangement	TF sites removed	TF sites created <sup>§</sup>
<b>RRD</b>	deletion P51-68	NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1β, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NFκB, POU2F2C, SXR:RXRα, USF2b, Pax2, LCR-F1	
	duplication P18-68		VDR, YY1, C/EBPα, C/EBPβ, POU2F2C, octamer binding factor, CUTL1, GCMA, ENKTF-1, NF1, AIRE, NFI/CTF, T3Rα, T3Rβ, USF2b, CREMα, Pax2, YY1, ERRα1, LCR-F1, c-FOS, ERα, ERβ, RARα1, SF-1, c-JUN, NHP1, RARβ, ARP-1, RXRα, COUP-TF, RORα1, TFIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1β, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NFκB, SXR:RXRα, LCR-F1  TFIIB, NF-X3, Nkx2-1, T3Rα1, RORα1, SF1 (at new P-P junction created by partial deletion and partial duplicated of P block)
<b>RRE</b>	deletion P33-63	GCMA, ENKTF-1, NF1, AIRE, NFI/CTF, T3Rα, T3Rβ, USF2b, CREMα, Pax2, YY1, ERRα1, LCR-F1, c-FOS, ERα, ERβ, RARα1, SF-1, c-JUN, NHP1, RARβ, ARP-1, RXRα, COUP-TF, RORα1, TFIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1β, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NFκB, SXR:RXRα, POU2F2C	
	deletion Q27-39	Pax6, HNF-1β, VDR, E2F-1	
	duplication P20-32		YY1, C/EBPα, C/EBPβ, POU2F2C
	duplication P64-68		
	delR6-63	POU2F2 (Oct2.1), HNF-3α, HNF-3β, FOXJ2, POU3F2, GRα, PRA/B, SRY, Nkx2-1, ELF-1, FOXN2, PU.1, GABP, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1β, Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, c-MYB, E47, ENKTF-1, TCF-1A, LEF-1, NF1, TCF-4E, NFI/CTF, BTEB3, Smad3/4,	
	deletion S1-6	NHP-1	Pax-2 (at new P-P junction created by the deletion)  MRF-2, HOXD9/10, HNF-1A (at Q-P junction)  c-JUN, c-FOS, NHP-1, TGIF (new R-S junction created by deletion)

NCCR variant*	Rearrangement	TF sites removed	TF sites created <sup>§</sup>
<b>RRF</b>	deletion R15-63	POU2F2 (Oct2.1), HNF-3 $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ , FOXJ2, POU3F2, GR $\alpha$ , PRA/B, SRY, Nkx2-1, ELF-1, FOXN2, PU.1, GABP, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1 $\beta$ , Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, c-MYB, E47, ENKTF-1, TCF-1A, LEF-1, NF1, TCF-4E, NF1/CTF, BTEB3, Smad3/4	
	deletion S1-6	NHP-1	PO3F2, RP58, POU2F2/Oct2.1 ( new R-S junction created by deletion)
<b>RRG</b>	deletion Q9-39	E47, ENKTF-1, LF-A1, c-MYB, HNF-1A, HNF-1B, Pax-6, GCF, E2F-1, VDR, Sp3, p53, Sp1, Ellae-A, EBF	
	duplication P25-68		GCMa, ENKTF-1, NF1, AIRE, NF1/CTF, T3R $\alpha$ , T3R $\beta$ , USF2b, CREM $\alpha$ , Pax2, YY1, ERR $\alpha$ 1, LCR-F1, c-FOS, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , RAR $\alpha$ 1, SF-1, c-JUN, NHP1, RAR $\beta$ , ARP-1, RXR $\alpha$ , COUP-TF, ROR $\alpha$ 1, TFIIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1 $\beta$ , Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NFkB, SXR:RXR $\alpha$ , LCR-F1
	duplication Q1-23		p53, ENKTF-1, E47, LF-A1, c-MYB
	deletion R1-63	POU3F2, POU2F2/Oct2.1, HNF-3 $\alpha$ , FOXJ2, POU3F2, GR $\alpha$ , HNF-3 $\beta$ , PRA/B, SRY, Nkx2.1, ELF-1, FOXN2, GABP $\alpha$ , GABP, c-Ets-1, PU.1, c-Ets-2, STAT5A, Elk-1, p300, STAT4, HMG I(Y), IRF-1, STAT1 $\beta$ , R2, NF-AT1, NF-AT2, c-MYB, E47, ENKTF-1, TCF-1A, LEF-1, NF1, TCF-4E, NF1/CTF, BTEB3, Elk-1, Smad3/4, E47	
	deletion S1-55	NHP-1, PRA/B, GR $\alpha$ , GR $\beta$ , C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , AP-2 $\alpha$ A, HSF, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, Elk-1, p300, STAT4, HMG I(Y), NF1/CTF, ENKTF-1, SRY, ANF, R2, MZF-1, E47, c-MYB, HNF-1A, HNF-3 $\beta$ , TCF-1A	E2F-1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ (at new Q-P junction) HNF-1A, HNF-3 $\beta$ , c-MYB (at Q-S junction)
<b>RRI, RRJ</b>	deletion P32-49	GCMa, ENKTF-1, NF1, AIRE, NF1/CTF, T3R $\alpha$ 1, USF2b, CREM $\alpha$ , Pax2, YY1, T3R $\beta$ 1, ERR $\alpha$ 1, RAR $\alpha$ 1, SF1, c-JUN, NHP1, RAR $\beta$ , ER $\beta$ , COUP-TF, ROR $\alpha$ 1, T3R $\alpha$ 1, TFIIIB, Nkx2-1	GCMa, E2F-1, R2 (at new P-P junction created by deletion)
<b>RRK</b>	duplication P23-33	POU2F2C, C/EBP $\alpha$ , octamer-binding factor, CUTL1	POU2F2C, Myf3, MyoD, POU2F, NF-X3, Tal1, OctB1, POU2FB (at new P-P junction created by duplication)

NCCR variant*	Rearrangement	TF sites removed	TF sites created <sup>§</sup>
<b>RRL</b>	deletion P42-50	T3R $\alpha$ , USF2b, CREM $\alpha$ , Pax2, YY1, T3R $\beta$ 1, ERR $\alpha$ 1, LCR-F1, ER $\alpha$ , RAR $\alpha$ 1, SF-1, c-JUN, NHP-1, RAR $\beta$ , ARP-1, RXR $\alpha$ , ER $\beta$ , COUP-TF1, ROR $\alpha$ 1, T3R $\alpha$ 1, TFIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, Elk-1, p300, STAT4, HMG I(Y), IRF-1, STAT1 $\beta$	NF-X3 and E47 (at new P-P junction created by deletion)
<b>RRM</b>	deletion Q34-36	E2F-1, VDR, E2F-1:DP-1, GCF, Sp3, p53, Sp1	
	duplication P14-68		AP3, VDR, YY1, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , POU2F2C, octamer binding factor, CUTL1, GCMA, ENKTF-1, NF1, AIRE, NF1/CTF, T3R $\alpha$ , T3R $\beta$ , USF2b, CREM $\alpha$ , Pax2, YY1, ERR $\alpha$ 1, LCR-F1, c-FOS, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , RAR $\alpha$ 1, SF-1, c-JUN, NHP1, RAR $\beta$ , ARP-1, RXR $\alpha$ , COUP-TF, ROR $\alpha$ 1, TFIIB, Nkx2-1, NERF-1a, c-Ets-1, c-Ets-2, STAT5A, STAT1 $\beta$ , Elk-1, p300, STAT4, IRF-1, HMG I(Y), R2, NF-AT1, NF-AT2, NF $\kappa$ B, SXR:RXR $\alpha$ , LCR-F1
	duplication Q1-33		p53, ENKTF-1, E47, LF-A1, c-MYB, HNF-1A, Pax6, HNF-1B c-MYB (at Q-P junction)

\* RRH is not included as this variant has only a 2 bp deletion in the S-block.

§ new transcription factor sites are created by duplication of sequences as well as by new junctions.

¶ RR: rearranged forms detected in this study

## **6.-Scientific Article: “BK virus-associated infection in cerebrospinal fluid of neurological patients and mutation analysis of the complete VP1 gene in different patient groups”**

### **6.1.-OBJETIVOS**

1.- Secuenciación de la proteína VP1 del poliomavirus BK identificada en los pacientes neurológicos, así como, en trasplantados renales, trasplantados de médula ósea y embarazadas para establecer si existen subtipos del poliomavirus BK o cambios aminoácídicos específicos de los pacientes neurológicos que puedan determinar las capacidades neurotrópicas del virus.

2.-Construcción del modelo estructural, basado en la homología con la proteína VP1 del SV40, de las distintas variantes de la proteína VP1 del virus BK observadas en los pacientes y controles de nuestro estudio, para evaluar si los cambios aminoácídicos identificados en las mismas puedan inducir alteraciones en la estructura de la proteína susceptibles de alterar su función.

### **6.2.-CONCLUSIONES**

1.- El subtipo I del poliomavirus BK fue mayoritario en todos los grupos de pacientes y controles del estudio, sin que se aprecien diferencias de frecuencia entre los distintos grupos de pacientes, por lo tanto no parecen existir diferencias entre subtipos en cuanto a neurovirulencia.

2.- El patrón de mutaciones de la proteína VP1 del poliomavirus BK no presenta diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes, por lo que los cambios aminoácídicos en VP1 no parecen ser un requisito fundamental para el desarrollo de patología neurológica o de otro tipo.

3.- El análisis de la proteína VP1 completa del poliomavirus BK en los pacientes y controles de nuestro estudio mostró que el bucle BC presenta una frecuencia de cambios aminoácídicos significativamente mayor que el resto de bucles externos, mientras que, en el bucle EF, dicha frecuencia se encuentra disminuída.



4.- El análisis mediante simulación de modelado molecular muestra que algunas de las variantes de la proteína VP1 observadas en pacientes de nuestro estudio podrían presentar cambios estructurales con posibles consecuencias para la interacción con los receptores celulares.

# BK Virus-Associated Infection in Cerebrospinal Fluid of Neurological Patients and Mutation Analysis of the Complete VP1 Gene in Different Patient Groups

ANA BÁRCENA-PANERO,<sup>1,2,3</sup> MARIJKE VAN GHELUE,<sup>4</sup> MAHMUD TAREQ HASSAN KHAN,<sup>5</sup> JUAN E. ECHEVARRÍA,<sup>2,3</sup> GIOVANNI FEDELE,<sup>6</sup> AND UGO MOENS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Host-Microbe Interaction Research Group, Department of Medical Biology, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø, Tromsø, Norway

<sup>2</sup>Laboratory of Isolation and Viral Detection, Service of Diagnostics in Microbiology, National Centre of Microbiology Carlos III Health Institute, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>3</sup>CIBERESP, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Medical Genetics, University Hospital of Northern-Norway, Tromsø, Norway

<sup>5</sup>GenØk—Center for Biosafety, Forskningsparken, Tromsø, Norway

<sup>6</sup>Department of Diagnosis Orientation, National Centre of Microbiology Carlos III Health Institute, Majadahonda, Madrid, Spain

While BK virus (BKV) is frequently associated with pathological conditions in bone marrow and renal transplant recipients, BKV infection in neurological individuals has been rarely reported. As a result of a BKV, JCV, and SV40 large T antigen-specific multiplex PCR on 2,062 cerebrospinal fluid (CSF) samples from neurological patients suspicious of JCV infection, we identified 20 subjects with at least 1 CSF specimen positive for BKV large T antigen DNA. Because VP1 protein has been suggested to influence the biological/pathological properties of BKV, we tried to sequence the entire VP1 gene in the BKV-positive neurological patients and succeeded in 14 of the 20 neurological patients. To compare the VP1 sequence of the BKV neurological strains with that of non-neurotropic strains in other clinical situations, full-length VP1 DNA was sequenced in 15 renal and 6 bone marrow transplant recipients positive to BKV-viremia, and in 8 pregnant women as non-pathological controls. An increased (respectively, decreased) tendency for mutations in the BC loop (respectively, EF loop) was observed, and no mutations were detected in the CD, GH, and HI loops. Subtype I was predominant (93%) and compared to archetypal BKV (WWW), amino acid substitutions were detected in 4/14 neurological patients, 10/15 renal transplant recipients, 3/6 bone marrow transplant patients, and in all the pregnant women. Each patient group had distinctive VP1 mutations, but these unique substitutions were not present in all patients of this group. However, molecular modeling simulations of the VP1 mutants predicted changes in protein surface properties which might affect the VP1–receptor interaction.

J. Cell. Physiol. 227: 136–145, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

The human polyomaviruses BK (BKV) and JC (JCV) are widely distributed in human populations as reflected by seroprevalence rates of 82% for BKV and 39% for JCV in healthy adult blood donors (Kean et al., 2009). Primary infection with BKV and JCV takes place during childhood, apparently by a respiratory or oral–fecal route, and appears asymptomatic. After primary infection, BKV and JCV establish latency in the urinary tract (Arthur et al., 1989), but also in mononuclear cells (Tornatore et al., 1992; Dorries et al., 1994) and in the central nervous system (CNS) (Vago et al., 1996). However, episodes of BKV and JCV urinary shedding can occur during diabetes, aging, pregnancy, and conditions of immunosuppression (Coleman et al., 1980; Markowitz et al., 1991; Bendiksen et al., 2000b; Bhattacharjee and Chakraborty, 2004; Zhong et al., 2007b). Polyomavirus reactivation linked to pathological manifestations is generally restricted to severe immunosuppressed patients such as polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) and urethral stenosis in renal transplant recipients and hemorrhagic cystitis (HC) in bone marrow transplant recipients. JCV is the etiologic agent of progressive

multifocal leukoencephalopathy (PML), a fatal demyelinating disease of the CNS that affects mainly AIDS patients (Berger, 2007). Although BKV DNA has been sporadically detected in brain tissue and cerebrospinal fluid (CSF) of both immunocompetent and immunocompromised subjects with or

Contract grant sponsor: Research Council of Norway;  
Contract grant number: 195586/V11.  
Contract grant sponsor: Mohn Foundation;  
Contract grant number: A5330.

\*Correspondence to: Ugo Moens, Host-Microbe Interaction Research Group, Faculty of Health Sciences, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, N-9037 Tromsø, Norway.  
E-mail: ugo.moens@uit.no

Received 9 December 2010; Accepted 23 February 2011

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com), 3 March 2011.  
DOI: 10.1002/jcp.22711

without neurological symptoms (Voltz et al., 1996; Behzad-Behbahani et al., 2003a,b), the neurotropic character is mostly associated to JCV. BKV's neurological involvement has been very poorly documented. The majority of the limited cases described were fatal meningoencephalitis or encephalitis in AIDS patients (Vallbracht et al., 1993; Bratt et al., 1999; Lesprit et al., 2001; Jorgensen et al., 2003). However, due to the scarce number of cases available for study, the exact mechanisms behind the ability of BKV to invade the CNS in these rare cases remain unclear.

The BKV genome consists of an approximately 5,300 bp circular DNA molecule and can be divided in three functional parts: the hypervariable non-coding control region (NCCR) and the highly conserved early and late regions (Cubitt, 2006). The NCCR contains the origin of replication (ori) as well as the promoter and enhancer for transcription of the early and late genes. The early region codes for large T antigen and small t antigen and for a truncated T antigen that has been described recently (Abend et al., 2009). The late region encodes the capsid proteins VP1, VP2, and VP3 and the agnoprotein, whose function is incompletely understood. VP1 is the major capsid protein and is involved in the interaction with host cellular receptors (Neu et al., 2009; Sapp and Day, 2009). VP1 is the target of neutralizing antibodies (Shah et al., 1977) and is able to produce hemagglutination (Bolen and Consigli, 1979). The crystal structures of the related Simian polyomavirus (SV40) and murine polyomavirus (mPyV) VP1 have been resolved (Liddington et al., 1991; Stehle et al., 1994, 1996) and showed that the VP1 monomer is composed of several  $\beta$ -strands that fit in a  $\beta$ -barrel structure with exposed loops AB, BC, CD, DE, EF, GH, and HI. Structural studies of mPyV VP1 in complex with its oligosaccharide receptor indicated that the BC and HI external loops seem to be involved in the receptor interaction (Stehle et al., 1994). The BKV VP1 BC loop includes a short region spanning amino acids 61–83 which is referred to as the subtyping region. Analysis of subtype-specific polymorphisms is employed in genotype classification (Jin et al., 1993). Based on this sequence, BKV strains can be classified into four main subtypes: subtypes I–IV. Phylogenetic studies in human populations revealed that subtype I is the most common one, followed by subtype IV. Subtypes II and III are infrequently identified (Jin et al., 1995; Baksh et al., 2001; Takasaka et al., 2004; Carr et al., 2006; Ikegaya et al., 2006; Krumbholz et al., 2006; Yogo et al., 2007; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2007a). The various BKV subtypes exhibit different replication efficiencies which could explain their variable distribution. Indeed, cell culture studies have underscored the importance of the VP1 composition for propagation of BKV. In human renal epithelial cells, subtype I strains grew more efficiently than subtype IV strains (Nukuzuma et al., 2006), while in Vero cells, subtype III displayed lower replication capacity than the other subtypes (Tremolada et al., 2010c). A study of Vero cells infected with BKV mutants containing substitutions in several charged amino acids within VP1 loops BC, DE, and HI showed that some of these mutants were deficient in genome packaging, capsid assembly, or binding to host cells (Dugan et al., 2007). The variability in the VP1 sequence may therefore contribute to the pathogenic properties of BKV isolates. Moreover, in the case of JCV, amino acid substitutions found exclusively in the external loops of VP1 in PML patients, but not in healthy individuals, were associated to a decrease in the hemagglutination properties (Sunyaev et al., 2009). Consequently, BKV subtypes distribution has been evaluated in different groups of immunosuppressed patients such as renal transplant recipients, bone marrow transplant patients, stem cell transplant recipients, AIDS patients, systemic lupus erythematosus (SLE) patients, and pregnant women (Jin et al., 1995; Bendiksen et al., 2000a; Baksh et al., 2001; Randhawa et al., 2002; Takasaka et al., 2004; Carr et al., 2006; Ikegaya et al.,

2006; Krumbholz et al., 2006; Gosert et al., 2008; Boldorini et al., 2009; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010a,b). In addition, the clinical involvement of BKV VP1 amino acid substitutions in the subtyping region has been assessed in patients with PVAN and SLE patients (Bendiksen et al., 2000a; Randhawa et al., 2002; Boldorini et al., 2009; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010a,b). However, in none of these studies, a specific subtype or pattern of mutations in VP1 was essential for the development of BKV-associated pathology. In biopsy specimens from PVAN patients, VP1 sequences (positions 1740–1833) were also found to be very variable and mutation hotspots were detected. Moreover, the sequences from each patient showed to be unstable over time (Randhawa et al., 2002).

The aim of this study was to investigate whether BKV-associated neurological infection exists and if so, whether this is linked to specific neurotropic BKV strains. In the period 1998–2009, 2,062 CSF samples suspicious of JCV infection were tested for the presence of BKV, JCV, and SV40 large T antigen DNA. Twenty neurological patients had at least one large T antigen DNA-positive CSF specimen. The entire VP1 protein sequence of these neurological BKV isolates was determined and compared to VP1 sequences from strains circulating in patients with other pathological conditions such as renal transplant recipients and bone marrow transplant recipients and from healthy pregnant women. Our results show an accumulation of amino acid substitutions in the BC loop, while a decreased tendency for EF loop mutations was found. No mutations were detected in the CD, GH, and HI loops. Although BKV with unique amino acid substitutions in VP1 were found for each patient group, not every individual in that group possessed these mutations. Moreover, different patient groups and healthy pregnant women harbored isolates with identical VP1 sequences. This suggests that VP1 polymorphism is not strictly necessary or sufficient for BKV-associated pathology and that specific strains are not related to a specific clinical manifestation. However, molecular modeling calculations indicate that the VP1 mutants may have altered host cell receptor binding properties.

## Materials and Methods

### Patients and clinical samples

Between 1998 and 2009, 2,062 CSF samples from neurological patients suspicious of JCV infection were tested for BKV, JCV, and SV40 DNA large T antigen DNA at the National Centre of Microbiology by the previously described multiplex nested PCR (Fedele et al., 1999). Twenty of these patients had BKV large T antigen DNA-positive CSF samples. These specimens were examined for the presence of BKV VP1 DNA and for DNA of herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 (HHV6), Epstein–Barr virus (EBV), and human enteroviruses (EVs) (including Polio-, Echo-, and Coxsackieviruses) by a nested multiplex PCR (Casas et al., 1997). From some of the patients, serum, blood, or urine specimens were available and these were also checked for BKV VP1 DNA (Table 1). The clinical conditions of these patients are summarized in Table 2.

Nineteen blood specimens and 1 serum sample from 20 renal transplant patients and 6 blood and 16 urine specimens from 7 bone marrow transplant recipients positive for BKV large T antigen DNA in at least one of their samples were also tested for BKV VP1 presence. Finally, 11 urine samples from 11 healthy pregnant women (18–39 weeks) with BKV viruria were checked for BKV VP1 DNA. The characteristics of this group were described in detail elsewhere and part of the VP1 gene had been sequenced previously (Bendiksen et al., 2000a,b).

TABLE 1. Detection of BKV and JCV large T antigen T, BKV VPI, human herpesviruses, and human enteroviruses nucleic acid sequences by PCR in samples obtained from neurological patients

Patients	Sample	PCR antigen T		PCR VPI BKV	PCR HV-EV
		BKV	JCV		
NP1	csf1	N	N	NT	N
	csf2	P	N	P	P HSV
NP2	csf	P	N	P	N
NP3	csf	P	P	P	N
NP4	csf1	P	N	P	NT
	Serum	N	N	NT	NT
	csf2	P	N	P	NT
	Urine	N	P	NT	NT
	Blood	N	N	NT	NT
NP5	Serum	P	N	P	NT
	csf	P	N	P	N
NP6	Urine1	N	N	NT	N
	Urine2	N	N	NT	NT
	Urine3	N	N	NT	NT
	csf	P	N	P	N
NP7	csf	P	N	P	P CMV, P EBV
NP8	csf	P	N	P	N
NP9	csf	P	N	P	N
NP10	csf	P	N	P	N
	Serum1	P	N	P	NT
	Urine	P	N	NA	N
	Serum2	N	N	NT	NT
NP11	csf	P	N	P	N
NP12	csf	P	N	P	P EBV
NP13	csf	P	N	P	N
NP14	csf1	P	N	P	N
	Urine	P	N	P	NT
	Blood	P	N	P	NT
	csf2	N	N	NT	N

csf, cerebrospinal fluid; N, negative; P, positive; NT, not tested; NA, not available; PCR HV-EV, multiplex nested PCR that detects herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 (HHV6), and Epstein-Barr virus (EBV).

## DNA extraction

DNA extraction was performed from 200  $\mu$ l of sample using Qiam MinElute Virus Spin kit (Qiagen, Izasa, Spain) according to the manufacturer's instructions. The DNA was eluted in a volume of 20–45  $\mu$ l nuclease-free water.

## PCR amplification of VPI sequences

In all PCR experiments, positive (a urine specimen from a BKV VPI-positive patient) and negative ( $H_2O$ ) controls were included. Different rooms for DNA extraction, PCR set up and analysis of the PCR products, as well as ultrapure reagents and equipment were employed in order to avoid contaminations. Amplification of the complete BKV VPI sequence was performed by nested PCR reactions. In the first reaction, the primers VPI-F1 (forward) 5'-AAACTATTGCCCCAGGAGGT-3' (nucleotides 1456–1475 in BKV strain Dunlop, accession number V01108) and VPI-R4 (reverse) 5'-CTAAACACACCACCCCAAAA-3' (nucleotides 2725–2744 in BKV strain Dunlop) were used, generating a fragment of 1,289 bp. A nested PCR was run with the primers VPI-F4 (forward) 5'-CTAATCAAAGAACTGCTCCTCAATG-3' (nucleotides 1477–1501 in BKV strain Dunlop) and VPI-R8 (reverse) 5'-ACCACCCCAAAAATAACACA-3' (nucleotides 2718–2737 in BKV strain Dunlop), producing a fragment of 1,261 bp. Both reactions were performed in a volume of 30  $\mu$ l including 500 nM of each primer, 15  $\mu$ l of Jumpstart (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and nuclease-free water. The first PCR was performed on 5  $\mu$ l eluted DNA, while 2  $\mu$ l of the first PCR product was used in the nested PCR. All PCR mixes were prepared in a laminar airflow hood. PCR conditions used were: denaturation for 5 min at 94°C and 40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55.7°C (or 64.9°C for the nested PCR), and 30 sec at 72°C. A final extension

step of 7 min at 72°C was included. Ten microliters of each PCR sample were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide. The amplicons were visualized by UV light.

## Sequencing of the amplified product

Nested PCR products were purified by adding 0.5  $\mu$ l exonuclease I and 0.5  $\mu$ l Shrimp alkaline phosphatase (VWR International, West Chester, PA). Samples were incubated for 1 h at 37°C and subsequently for 15 min at 85°C. Sequencing of both strands of the PCR products was performed with the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) together with 250 nM of the primers VPI-F4 and VPI-R8. Cycle sequencing PCR conditions consisted of 30 cycles of 10 sec at 96°C, 5 sec at 50°C, and 4 min at 60°C. Sequencing reactions were analyzed on an ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems).

## Analysis of VPI sequences and genotyping

Sequences were aligned with Seqscape v2.5 software and compared to the reference VVW strain (accession number AB211371) except for amino acid residue K73 where E was taken into account because it is the most common one in other BKV strains. BKV genotypes were assigned to each sample according to Jin et al. (1993).

## Homology based model building, refinement, and quality evaluation

The template protein database coordinates of SV40 VPI refined at 3.1 Å resolution (Stehle et al., 1996) were retrieved, and used to build the BKV VPI model applying the ICM™ Bioinformatics module. The ICM program constructs the molecular model by homology from core sections defined by the average of C $\alpha$  atom positions in conserved regions. The model quality check was performed using Structural Analysis and Verification Server (SAVS, <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>). The algorithms PROCHECK (Morris et al., 1992; Laskowski et al., 1993), WHAT\_CHECK, ERRAT (Colovos and Yeates, 1993), VERIFY\_3D (Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992), and PROVE were used to calculate quality factors of both the template SV40 VPI (Stehle et al., 1996) and the generated 3D model of BKV VPI. The total, local, burial, and contact energies of the predicted models were calculated using predicted structure quality score (PSQS) (<http://www1.jcsg.org/psqs>, Godzik et al., 1995; Godzik, 1996; Pawlowski et al., 1997; Jaroszewski et al., 1998).

## Root mean squared deviation (RMSD) and solvent accessible surface area (SASA) calculations

The 3D structures of SV40 VPI (Stehle et al., 1996) and the BKV VPI models were superimposed and their RMSD between backbone C $\alpha$  atoms value was calculated utilizing DaliLite ([www.ebi.ac.uk/DaliLite](http://www.ebi.ac.uk/DaliLite); Holm and Park, 2000) and ICM Bioinformatics module in order to compare their overall 3D structures and active site architecture. The SASA (in Å<sup>2</sup>) of the reference sequence and all the mutated models have been calculated using an ICM script for this purpose.

## Results

### Amplification of BKV VPI in the clinical samples of neurological patients, renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients, and pregnant women

Twenty neurological patients whose CSF sample was positive for BKV large T antigen DNA were further assessed for the presence of VPI sequences. A PCR product corresponding to the full-length BKV VPI gene was successfully amplified in 14 of these 20 patients. These patients are hereafter referred to as NP1 to NP14 (Tables 1 and 2). From some of these patients

TABLE 2. Clinical and demographic data and results of genotyping and VPI primary structure analysis of the patients included in this study

Patients	Clinical condition	Gender	Age (years)	Sample	BKV subtype	VPI primary structure
NP1	HIV; meningitis	Male	32	CSF	I	Reference
NP2	HIV; encephalitis	Male	26	CSF	I	Reference
NP3	HIV	Male	56	CSF	I	Reference
NP4	HIV; chronic hepatitis; neuropathy; brain astrocytoma and death	Female	47	CSF1	II	Variant 1
NP4				CSF2	I	Reference
NP5	Breast cancer; PML	Female	73	Serum	I	Variant 2
NP5				CSF	I	Reference
NP6	Chronic myeloid leukemia; HC	Female	13	CSF	I	Reference
NP7	HIV; PML	Female	NA	CSF	I	Reference
NP8	HIV; PML	Male	NA	CSF	I	Reference
NP9	HIV; brain lymphoma	Male	37	CSF	I	Reference
NP10	Blackfan–Diamond anemia; encephalopathy; BMT; HC	Female	5	CSF	I	Reference
NP10				Serum	I	Reference
NP11	HIV; psychotic and psychomotor alterations	Female	44	CSF	I	Variant 3
NP12	Multiple sclerosis	Female	52	CSF	I	Variant 4
NP13	HIV; encephalopathy	Male	43	CSF	I	Reference
NP14	Anaplastic anemia; PML; HC	Male	NA	CSF	I	Reference
NP14				Urine	I	Reference
NP14				Blood	I	Reference
RTR15	Suspicious of PVAN	Male	55	Blood	I	Variant 5
RTR16	Suspicious of PVAN	Male	36	Blood	I	Variant 6
RTR17	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	IV	Variant 7
RTR18	Suspicious of PVAN	Female	NA	Blood	I	Reference
RTR19	Suspicious of PVAN	Female	NA	Blood	I	Variant 8
RTR20	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	I	Variant 8
RTR21	NA	Female	44	Blood	I	Reference
RTR22	NA	Male	50	Blood	I	Variant 9
RTR23	Suspicious of PVAN	Female	38	Blood	I	Variant 10
RTR24	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	I	Reference
RTR25	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	I	Variant 11
RTR26	Suspicious of PVAN	Male	73	Blood	IV	Variant 12
RTR27	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	I	Reference
RTR28	Suspicious of PVAN	Male	NA	Blood	I	Reference
RTR29	NA	Male	59	Serum	I	Variant 8
BMT30	Acute lymphoblastic leukemia; HC	Male	10	Blood	I	Reference
BMT30				Urine	I	Reference
BMT31	HC	Female	13	Urine	II	Variant 1
BMT31				Urine	II	Variant 1
BMT31				Blood	II	Variant 1
BMT31				Urine	II	Variant 1
BMT32	NA	Female	45	Urine	III	Variant 13
BMT32				Urine	III	Variant 13
BMT32				Blood	I	Variant 4
BMT33	Diffuse large B-cell lymphoma; HC	Female	20	Urine	I	Reference
BMT33				Blood	I	Reference
BMT33				Urine	I	Reference
BMT34	Dendritic cells leukemia; HC	Male	15	Urine	I	Variant 11
BMT35	NA	Male	12	Blood	I	Reference
BMT35				Urine	I	Reference
PW1	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 14
PW2	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 14
PW3	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 14
PW4	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 15
PW5	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 14
PW6	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 16
PW7	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 17
PW8	Healthy pregnant woman	Female		Urine	I	Variant 4

BMT, bone marrow transplant recipients; CSF, cerebrospinal fluid; HC, hemorrhagic cystitis; NA, not available; NP, neurological patient; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; PW, pregnant woman; RTR, renal transplant recipient.

additional serum, blood, or urine samples were available, and a complete VPI amplicon was obtained from one blood and one urine sample of NP14, and one serum sample of NP5 and NP10 (Tables 1 and 2). JCV large T antigen sequences were also detected in CSF of patient NP3 and in urine, but not in CSF of NP4. HSV was identified in CSF of patients NP1, EBV, and CMV were present in CSF of NP7, while CSF of NP12 was positive for EBV (Table 1).

Positive amplification of full-length BKV VPI DNA was also achieved for 15 of the 20 renal transplant recipients tested (referred to as RTR15–29; Table 2), 6 of 7 bone marrow transplant recipients (referred to as BMT30–35; Table 2), and 8 of 11 pregnant women (referred to as PW1–8; Table 2). The positive VPI specimens included 14 blood samples and 1 serum sample from the 15 kidney transplant recipients (Table 2); 5 out

of 5 blood and 10 out of 16 urine specimens from 6 bone marrow transplant recipients (Table 2); and from 8 urine samples of 8 of 11 pregnant women (Table 2). Thus, in total we had 43 different individuals (including patients and controls) with one or several BKV VPI PCR-positive samples.

#### Detection of BKV VPI amino acid substitutions

Comparison of these primary VPI sequences obtained from our patients with the reference strain revealed that 25 out of the 43 patients were infected with BKV isolates with VPI divergent from the reference sequence (Table 2). Polymorphism was observed in 35 different amino acids (Fig. 1 and Table 3). Of the 35 different VPI residues mutated, 18 resided in one of the loops (Fig. 1 and Table 4). Amino acids



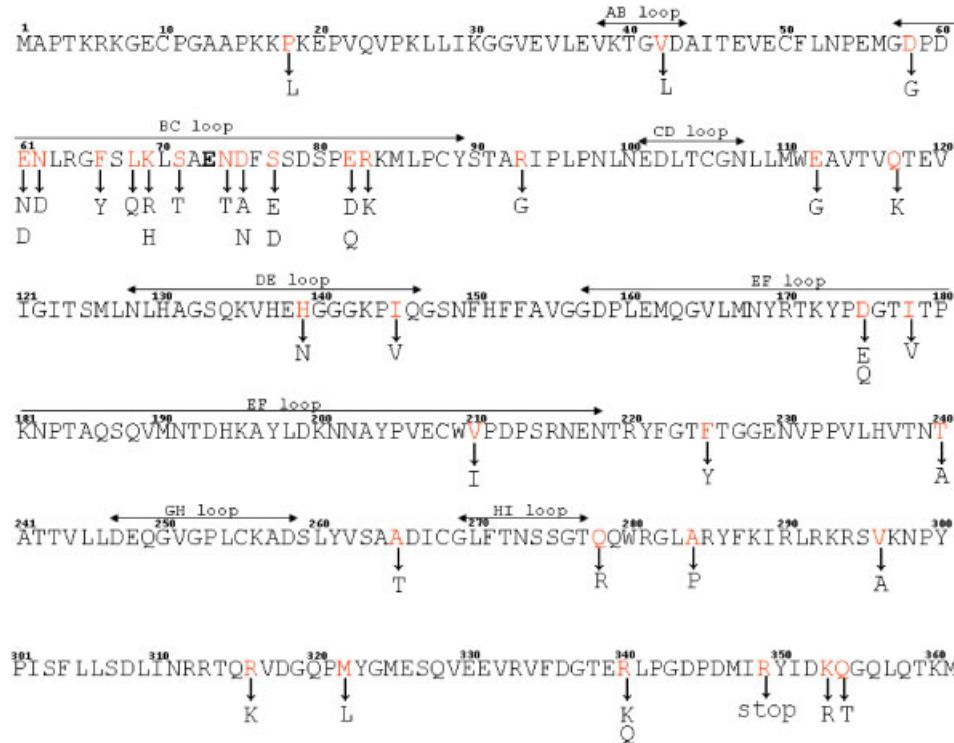


Fig. 1. Primary sequence of the BKV VPI reference. This sequence is identical to the VPI of BKV (WW) except that residue for K73, an E was taken because this amino acid is the most common one in other BKV strains. This residue is shown in bold. The amino acids that were found to differ from the reference VPI sequence are indicated in red and the substitutions are shown. The position of the different loops is indicated. The numbers refer to the positions of the amino acid residues. See text and Table 3 for details.

substitutions were detected in all patient groups examined. One patient harbored a BKV isolate encoding truncated VPI (NP5) due to a missense mutation.

BKV with a specific VPI sequence could be detected in several patient groups (Table 2). BKV variant I was identified in a neurological patient (NP4) and in a bone marrow recipient (BMT31). Accordingly, variant 4 circulated in NP12, BMT32, and PW8, while variant II was found in RTR25 and BMT34 (Tables 2 and 3).

Four of the 14 neurological patients for which a VPI-positive PCR product was obtained had VPI sequences that diverged from the reference strain. Mutations P18L in VPI of NP5 and E82Q in VPI of NP11 were exclusively confined to this patient group (Table 3). Interestingly, one CSF sample of NP4 contained the VPI reference sequence, whereas a BKV strain with amino acid substitutions in VPI was identified in a second CSF sample (Table 2). The VPI variant in a serum sample of NP5 differed from the reference VPI sequence that was present in CSF of this patient (Table 2).

Ten renal transplant patients had non-reference strain VPI amino acid sequences (Table 2). The amino acids substitutions E61N, N62D, K69R, N74T, I178V, A265T, A284P, and Q354T were unique for this patient group (Table 3), while the most common mutations were D175E and V210I (Table 3). Interestingly, exactly the same variant was identified in RTR19, 20, and 29 (variant 8, Tables 2 and 3).

Three bone marrow transplant patients showed polymorphism in VPI compared to the reference sequence (Table 2). While BMT31 presented identical sequences in urine and blood, BMT32 had BKV with different VPI sequences in her blood and urine. The primary structure of VPI in urine samples collected at different time points did, however, not change,

indicating stability of the VPI protein in this circulating BKV variant. The amino acid substitutions L68Q and K69H were restricted to this patient group, whereas the most common polymorphism was V210I (Table 3).

All pregnant women secreted BKV with VPI sequences different from the reference sequence (Table 2). The substitutions T240A (PW4), Q278R and M322L (PW6) and D58G, R93G, E112G, and V296A (PW7) were limited to this group (Table 3). Pregnant women 1, 2, 3, and 5 harbored a strain with identical VPI sequence (variant I4, Tables 2 and 3).

BKV with a specific VPI sequence could be detected in several patient groups (Table 2). BKV variant I was detected in a neurological patient (NP4), a bone marrow recipient (BMT31) and in healthy control (PW8). Accordingly, variant 4 circulated in NP12, BMT32, and PW4, while variant II was found in RTR25 and BMT34 (Table 2).

While the BC loop makes up only 9.1% of the total VPI protein, 34.3% of the amino acids substituted were detected in this region. This suggests that there is a positive tendency towards mutations in this region. On the other hand, the EF loops forms 17.1% of the total VPI, but only 8.6% of the amino acid substituted resided in this loop, suggesting a negative tendency for mutations in this region.

BKV genotyping

BKV genotyping revealed that subtype I was detected in 40 of 43 (93%) BKV VPI PCR-positive patients and controls (Table 2). All neurological patients harbored BKV subtype I in their specimens, except patient 4 who also had one CSF sample that contained BKV subtype II, while the other CSF sample of this patient contained BKV subtype I. Subtype II also circulated in

TABLE 3. Amino acids substitutions found in the VPI of BKV isolates from different patient groups

Patient	AB		BC											DE				EF			
	P18	V42	D58	E61	N62	F66	L68	K69	S71	N74	D75	S77	E82	R83	R93	E112	Q117	H139	I145	D175	I178
NP4csf				D		Y			T		A	D	D	K			K	N	V	Q	
NP5 serum	L	L																		E	
NP11csf													Q								
NP12csf		L																		E	
Frequency	1	2		1		1			1		1	1	2	1			1	1	1	3	
RTR15bl		L																		E	
RTR16bl																					
RTR17bl				N	D	Y		R	T	T	A	E	D				K	N		E	V
RTR19bl		L																		E	
RTR20bl		L																		E	
RTR22bl		L						R												E	
RTR23bl											N									E	
RTR25bl		L																		E	
RTR26bl				N	D	Y		R	T	T	A	D	D				K	N		E	V
RTR29ser		L																		E	
Frequency	6			2	2	2		3	2	2	3	2	2				2	2		8	2
BMT31u				D		Y			T		A	D	D	K			K	N	V	Q	
BMT31bl				D		Y			T		A	D	D	K			K	N	V	Q	
BMT32u				D		Y	Q	H			A	E	D				K	N	V	Q	
BMT32bl		L																		E	
BMT34		L																		E	
Frequency	2			3		3	1	1	2		3	3	3	2			3	3	3	5	
PW1		L																		E	
PW2		L																		E	
PW3		L																		E	
PW4																					
PW5		L											D							E	
PW6																					
PW7			G												G	G					
PW8		L																		E	
Frequency	5	1																		5	
Total frequency <sup>a</sup>	1	15	1	6	2	6	1	4	5	2	7	6	11	3	1	1	6	6	4	21	2

Patient	EF														Frequency <sup>b</sup>
	V210	F225	T240	A265	Q278	A284	V296	R316	M322	R340	R349	K353	Q354	L362	
NP4csf	1	Y						K		Q		R		V	17
NP5 serum	1									K	stop				6
NP11csf	1														1
NP12csf	1													V	4
Frequency	3	1						1		2	1	1		2	28
RTR15bl	1			T						K					5
RTR16bl													T		1
RTR17bl	1	Y				P				Q		R		V	19
RTR19bl	1														3
RTR20bl	1														3
RTR22bl	1														4
RTR23bl															1
RTR25bl	1									K					4
RTR26bl	1	Y				P				Q		R		V	19
RTR29ser	1														3
Frequency	8	2		1		2				4		2	1	2	62
BMT31u	1	Y							K	Q		R		V	17
BMT31bl	1	Y							K	Q		R		V	17
BMT32u	1	Y							K	Q		R		V	17
BMT32bl	1													V	4
BMT34	1									K					4
Frequency	5	3						3		4		3		4	59
PW1	1														4
PW2	1														4
PW3	1														4
PW4			A												1
PW5	1														4
PW6					R				L						2
PW7							A								4
PW8	1													V	4
Frequency	5		1		1		1		1					1	27
Total frequency <sup>a</sup>	21	6	1	1	1	2	1	4	1	10	1	6	1	9	176

NP, neurological patient; RTR, renal transplant recipient; BMT, bone marrow transplant recipient; PVV, pregnant woman; bl, blood; csf, cerebrospinal fluid; ser, serum; u, urine.

<sup>a</sup>Total number of times this residue was substituted in all VPI PCR-positive samples.<sup>b</sup>Total amino acid substitutions in VPI of this patient.

TABLE 4. Amino acid substituted found in the different loops of VPI

Loop	Number of residues	% of VPI <sup>a</sup>	Number of mutations	% of total mutations <sup>b</sup>	Number of patients with this mutation (%) <sup>c</sup>
AB	6	1.7	1	2.9	15 (34.9%)
BC	33	9.1	12	33.4	13 (30.2%)
CD	7	1.9	0	0	NA
DE	19	5.2	2	5.7	5 (11.6%)
EF	62	17.1	3	8.6	19 (44.2%)
GH	12	3.3	0	0	NA
HI	9	2.5	0	0	NA

<sup>a</sup>VPI contains 362 amino acids.<sup>b</sup>Amino acid replacements were observed in 35 different residues of the loop regions of VPI (see Table 3).<sup>c</sup>VPI sequences were obtained for 43 individuals between patients and controls (14 NP, 15 RTR, 6 BMT, 8 PW).

one bone marrow patient (BMT31), where it was found in both urine and blood. BKV subtype III was only detected in the urine of bone marrow transplant patient (BMT32), while two renal transplant patients (RTR17 and RTR26) had BKV subtype IV in their blood.

### Structural implications of the mutations

To predict the structural effects of mutations in VPI, changes solvent accessible surface areas (SASA) of each mutated protein were calculated. SASA is a parameter that is widely used in analyses of protein structure (Pintar et al., 2003). The changes in SASA (in Å<sup>2</sup>) in comparison with the reference sequence are shown in Figure 2. The VPI isoforms present in NP4csf, RTR15, RTR17, RTR26, BMT32u, BMT34, PW6, and PW8 displayed a strong decrease ( $>-130$  Å<sup>2</sup>), while an increase in SASA was calculated for VPI in patients NP12, RTR19/20, RTR22, BMT32bl, and PW4 compared to the reference VPI. These variations in SASA may affect the structure of VPI.

### Discussion

#### BKV-associated neurological infection

BKV-associated infection has been extensively examined in large cohorts of renal and bone marrow transplant recipients,

autoimmune patients, and pregnant women, whereas only a very limited number of studies have reported BKV infection in neurological patients and most of these studies are mainly case reports (Vallbracht et al., 1993; Vago et al., 1996; Voltz et al., 1996; Bratt et al., 1999; Hedquist et al., 1999; Lesprit et al., 2001; Garavelli and Boldorini, 2002; Stoner et al., 2002; Jorgensen et al., 2003; Behzad-Behbahani et al., 2003a,b; Hix et al., 2004; Cabrejo et al., 2005; Vidal et al., 2007). Over the last 11 years we have been using nested PCR to test 2,062 spinal fluid specimens obtained from neurological patients suspicious of JCV infection for the presence of JCV, SV40, and BKV large T antigen DNA. As a result, we have identified 20 individuals with at least one BKV-positive CSF sample. Although BKV-associated neurological infection has been reported mainly in AIDS patients suffering from meningoencephalitis or encephalitis, neurological presentation of our patients was quite heterogenic, being PML the most common affection, as in the case of JCV. Most of our patients suffered from AIDS, but also other pathologies not previously associated with BKV neurological infection such as anemia (NP10, NP14), breast cancer (NP5), and multiple sclerosis (NP12) were identified. A brain astrocytoma and a brain lymphoma were detected in patients NP4 and NP9, respectively (Table 2). The latter findings confirm previous studies reporting BKV in malignant brain tissues (Moens and Johannessen, 2008), but the causative role of BKV in human brain tumors is still ambiguous.

Effects of point mutations on SASA:

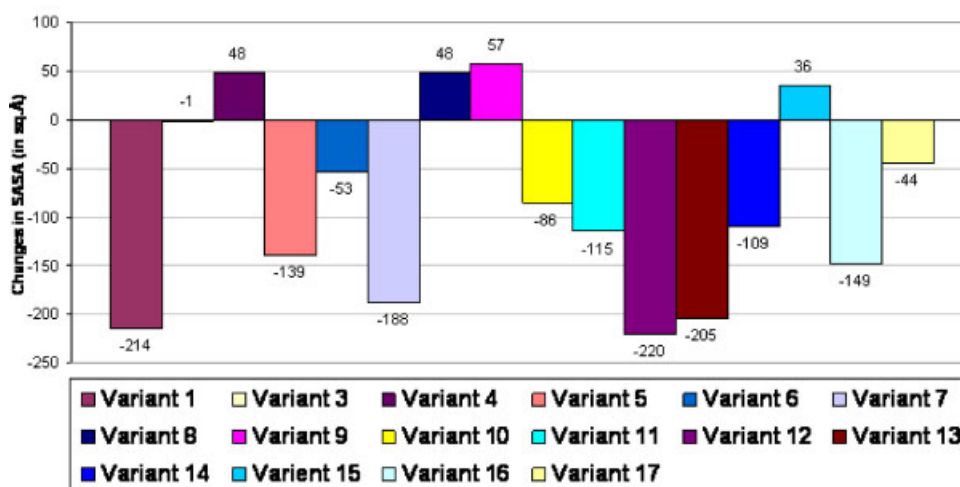


Fig. 2. Effect of mutations in VPI on solvent accessible surface areas (SASA in Å<sup>2</sup>). The SASA were calculated using ICM<sup>TM</sup>. The SASA value of each VPI variant was compared with the value obtained for the reference VPI sequence. The numbers on top or under the bars represent the changes in SASA compared to the reference VPI sequence. Variant 2 had a missense mutation and thus encoding a truncated version of VPI. The SASA of this variant was not calculated. See Table 2 for the patients corresponding to the variants.



BKV DNA was present in other specimens than CSF in three neurological patients. NP5 was positive for BKV DNA in serum (no urine sample was available), NP10 had BKV DNA in serum and urine, and NP14 was BKV positive in urine and blood (Table 1). In conditions of severe immunosuppression, as is the case with our patients, BKV can reactivate in the urogenital tract, as it has been shown in the patients NP10 and NP14. All three patients are positive for BKV in their blood and thus the virus can disseminate by the blood system to different organs. Patient NP4, however, was negative to BKV viremia and viruria. Hence, for this patient we can postulate an independent reactivation of BKV in the CNS although the exact mechanism remains unclear.

### VPI polymorphism and cell tropism

Considering that only one sequence of the BKV VPI from the CSF of a neurological patient has been reported (Stoner et al., 2002), it is impossible to hypothesize whether a specific BKV VPI polymorphism may be associated with neurotropism. We determined the entire VPI sequence in the BKV large T antigen DNA-positive samples from 14 neurological patients, but also in bone marrow transplant recipients, renal transplant patients, and healthy pregnant women. Our sequence analysis revealed that there is no specific pattern of mutation associated to the neurological patients or other clinical presentation. This is exemplified by BKV variants I, 4, and II which were present in several patient groups. A lack of such correlation has earlier been reported in nephropathy and SLE patients (Jin et al., 1995; Bendiksen et al., 2000a; Baksh et al., 2001; Randhawa et al., 2002; Boldorini et al., 2009; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010a,b). Identical strains (variants I, 4, and II) were detected in different patient groups, suggesting that a particular BKV strain is not associated with a specific disease. On the other hand, RTR19, 20, and 29 contained a BKV isolate in their blood with exactly the same VPI amino acid substitutions. Whether this strain is associated specifically with the reactivation of BKV in renal transplant patients should be elucidated.

Ten not previously described amino acids substitutions were identified in VPI in our study. One of them was confined to BKV isolates from neurological patients: P18L in NP5. The other not previously reported amino acids changes including D58G, R93G, E112G, T240A, Q278R, V296A, and M322L that were only detected in BKV isolates in the urine of pregnant women, and A265T and Q354T identified in the blood of the renal transplant recipients RTR15 and RTR16, respectively.

In a recent study, mutations in the BC-loop of BKV isolates obtained from urine samples of 45 kidney transplant patients were determined (Krautkramer et al., 2009). Two of the mutations (E82D and H139N) reported by these authors were also identified in this study in RTR17 and RTR26, in a BKV isolate in the CSF of one neurological patient (NP4) and in two out of six of our bone marrow transplant patients (BMT31 and BMT32). While all of these patients had BKV with both mutations, only one renal transplant patient (#286) in the study by Krautkramer et al., harbored BKV with both mutations and three other recipients had only the E82D mutation. Several pregnant women excreted BKV with the E82D mutation, but none had the H139N substitution. Hence the H139N mutation, which resides in the DE-loop, was only detected in individuals with pathological conditions in the present study.

In an elegant study, Dugan et al. (2007) investigated the effect of single amino acid substitutions in VPI on viral viability and growth in Vero cells. The authors generated 17 BKV VPI mutants (16 single and 1 double amino acid substitution). Several of the residues that they substituted were also mutated in our isolates, including E61, K69, D75, E82, and R83. Dugan et al. replaced the charged amino acids by the small, non-

charged Ala. The K69A mutations reduced viral spread, while the E61A produced non-viable virus, but it bound better to the host cell receptor. Although most of our strains possessed additional mutations, BKV isolates detected in the blood of RTR23 and in the CSF of NP11 contained only the substitutions D75N and E82Q. Both mutations cause the change of a negatively charged amino acid to a neutral amino acid. Dugan et al. showed that mutants with the double D75A/E82A substitution, which replaced negatively charged amino acids into neutral ones, had reduced VPI expression, but propagated equally well as wild-type (Dugan et al., 2007). The substitution D75N has been previously identified in BKV present in all the biopsy samples of a patient who developed PVAN (Boldorini et al., 2009). The effect of the double mutation D75A/S77D that mimics the polymorphism seen in subtypes II, III, and IV was also examined by Dugan and coworkers. This mutant is able to propagate *in vitro* similarly to BKV, showing that subtypes II, III, and IV *in vitro* are comparable to BKV wild-type (Dugan et al., 2007). One CSF from a neurological patient (NP4), one renal transplant recipient (RTR26), and one bone marrow transplant recipient (BMT31) acquired a BKV isolate with this double amino acid substitution, indicating that this BKV variant can replicate *in vivo* under different clinical conditions.

Finally, in a recent study, BKV mutants with different amino acid substitutions that had been identified in the BC loop of the BKV VPI of several patients with PVAN were tested in culture. A subtype I variant with the K69R mutation showed a more profound cytopathogenic effect compared to the reference variant and was able to replicate and grow in cell culture. The authors suggested a possible correlation of the mutation and BKV PVAN pathogenesis (Tremolada et al., 2010a). In our study, one renal transplant recipients, RTR22, contained a genotype I strain with this substitution.

### Hotspot sites of VPI mutations

Mutations in 35 different VPI residues were detected in this study. The BC loop encompasses 9.1% of the total VPI protein and 12 of the 35 (34.3%) of the amino acid substituted were located in this loop. On the other hand, the EF loop constitutes 17.1% of the total VPI protein, yet only 3 out of the 35 amino acid substitutions (8.6%) were encompassed in this region. This suggests that there is an increased tendency of mutations in the BC loop, while there is a decreased predisposition for mutations in the EF loop. VPI hotspots of variability have already been described in the sequences of biopsies of PVAN patients (Randhawa et al., 2002). The mutation frequency in the other regions was as statistically expected (Table 4). However, no mutations were identified in the CD, GH, and HI loops, a finding that is in agreement with a preceding study that presented the whole VPI loops sequence obtained from PVAN patients and controls (Tremolada et al., 2010b).

### VPI polymorphism and molecular modeling

Calculation of the solvent accessible surface area as an indication of the structural implications of the amino acid substitutions in VPI revealed that several VPI isoforms had considerable decrease or increase in their SASA value. This may indicate structural changes, specifically surface electronic charges or properties in VPI that can interfere with the molecular recognition of VPI with its receptor and hence affect the biological properties of the virus. Functional studies are required to confirm these predictions.

### VPI polymorphism and immunogenicity

Because VPI is the only structural compound of the intact virion that is directly accessible to the immune system, mutations in

VPI may affect the immunogenic properties of BKV and hence the pathogenicity of the virus. Schneidawind et al. (2010) tested isolated CD8<sup>+</sup> T cells from healthy individuals ( $n = 25$ ) and from patients with HC ( $n = 7$ ) for specific responses against five different VPI peptides. Five of the HC patients (71%) had CD8<sup>+</sup> T cells that showed a strong response against peptide p108, while only seven healthy individuals (28%) had CD8<sup>+</sup> T cells responding to this peptide. Moreover, whereas none of the patients possessed T cells that responded to any of the other four of the five peptides, healthy individuals (<15% of the patients) had such responsive T cells. The peptide p108, spanning amino acids 108–116 (sequence LLMWEAVTV), is just adjacent to the CD loop (see Fig. 1). A previous study revealed BKV VPI peptide p108-specific T cells in 2/2 renal transplant patients (Krymskaya et al., 2005) and in 10/10 renal transplant patients with PVAN, but only in 5/10 healthy individuals (Chen et al., 2006). These findings may indicate that this strong immunogenic epitope may play a crucial role in the development and containment of HC and PVAN. All the individuals with different diseases in our study had conserved this sequence, while one out of eight pregnant women contained a mutation in this region (PW7 with the mutation E112G). Although we did not test our patients for p108-reactive CD8<sup>+</sup> T cells, this epitope does not seem uncommon in the human population. It is therefore not possible to conclude whether the E112G mutation generates a less immunogenic VPI protein so that the biological importance of this mutation remains elusive.

### Truncated VPI

The BKV isolate in a serum sample of one neurological patient (NP5) had a nonsense mutation changing R349 into a stop codon. It is uncertain whether such truncated VPI can assemble into infectious virions. This variant may represent mutant BKV genomes trapped in defective particles. Alternatively, reactivation allows increased BKV DNA replication, which can produce wild-type as well as mutant genomes in the infected cells. The mutant genomes can be incorporated in wild-type virus particles. The CSF sample of NP5 contained full-length VPI sequences, indicating that intact virion particles can be produced. Because PCR preferentially amplifies the most abundant molecule, it can be assumed that the mutants were overrepresented in the patient's urine or serum specimen. Cloning of BKV genomes may have identified wild-type (and other) BKV genomes, while electron microscopy studies and infectious virus rescue studies may have allowed to test whether infectious virus was excreted by these patients.

### BKV genotypes in the different patient groups

BKV genotyping revealed that 40 out of the 43 patients from which we obtained full-length VPI sequences were infected with subtype I. This is in agreement with previous findings that have shown that this is the most prevalent subtype (Jin et al., 1995; Baksh et al., 2001; Takasaka et al., 2004; Carr et al., 2006; Ikegaya et al., 2006; Krumbholz et al., 2006; Yogo et al., 2007; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2007a). Subtypes were not linked to a specific patient group, indicating that they are not correlated with the clinical condition. Two patients, a 47-year-old HIV-positive female (NP4; Table 2) and a 13-year-old female bone marrow transplant with HC (BMT31; Table 2) had subtype II. Interestingly, one of the CSF samples of the HIV-positive patient with neurological condition (NP4) contained BKV subtype I while another CSF sample contained subtype II. A 45-year-old female bone marrow recipient (BMT32; Table 2) excreted BKV subtype III in her urine, while subtype I was detected in her blood. This indicated that these patients were infected with two different subtypes which concurs with previous studies (Jin et al., 1995; Bendiksen et al., 2000a;

Randhawa et al., 2002). Moreover, a breast cancer patient (NP5; Table 2) harbored strains of subtype I in both CSF and serum. However, the variant found in CSF was identical to the reference strain while the variant detected in serum contained several amino acid substitutions in VPI. In a scenery of extreme immunosuppression and subsequent BKV reactivation in the urinary tract, a specific variant may have been selected in a secondary site, for example, the CNS or the blood system, as a response to host tissue-specific genes (Stoner et al., 2002; Jorgensen et al., 2003). On the other hand, subsequent urine samples of BMT31 and BMT32 harbored identical strains over time. Jin et al. (1995) showed that sequential urine samples from bone marrow transplant recipients detected for up to 3 months conserved the same subtypes.

### Conclusions

In conclusion, our results indicate that BKV DNA can be detected in the CSF of patients with neurological symptoms and therefore BKV-associated neurological infection can occur. Mutations in VPI indicate genomic instability, but as with other patient groups, the sequence of BKV VPI does not seem to carry a characteristic fingerprint for this clinical condition. However, our results from sequencing the entire VPI may indicate that mutations are not randomly dispersed in VPI, but the BC-loop seems more, while the EF-loop seems less exposed to mutations. Additional studies are required to determine the effect of VPI mutations on the biological and pathological properties of BKV.

### Acknowledgments

This work was supported by the Research Council of Norway (195586/V11) and the Mohn Foundation (A5330).

### Literature Cited

- Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ. 2009. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol* 90:1238–1245.
- Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. 1989. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1174–1179.
- Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschewitsch CF, Randhawa P. 2001. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 38:354–365.
- Behad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM. 2003a. BK virus DNA in CSF of immunocompetent and immunocompromised patients. *Arch Dis Child* 88:174–175.
- Behad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Bonington A. 2003b. BKV-DNA and JCV-DNA in CSF of patients with suspected meningitis or encephalitis. *Infection* 31:374–378.
- Bendiksen S, Rekvig OP, Van Ghelue M, Moens U. 2000a. VPI DNA sequences of JC and BK viruses detected in urine of systemic lupus erythematosus patients reveal no differences from strains expressed in normal individuals. *J Gen Virol* 81:2625–2633.
- Bendiksen S, Van Ghelue M, Rekvig OP, Gutteberg T, Haga HJ, Moens U. 2000b. A longitudinal study of human cytomegalovirus serology and viraemia fails to detect active viral infection in 20 systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 9:120–126.
- Berger JR. 2007. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:461–469.
- Bhattacharjee S, Chakraborty T. 2004. High reactivation of BK virus variants in Asian Indians with renal disorders and during pregnancy. *Virus Genes* 28:157–168.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, Monga G, Pietropaolo V. 2009. Genomic mutations of viral protein 1 and BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. *J Med Virol* 81:1385–1393.
- Bolen JB, Consigli RA. 1979. Differential adsorption of polyoma virions and capsids to mouse kidney cells and guinea pig erythrocytes. *J Virol* 32:679–683.
- Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D. 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253:164–170.
- Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* 13:1071–1075.
- Cabrejo L, Diop M, Blohorn-Sense A, Mihout B. 2005. Progressive BK virus associated multifocal leukoencephalopathy in an immunocompromised patient treated with corticosteroids. *Rev Neurol (Paris)* 161:326–330.
- Carr MJ, McCormack GP, Mutton KJ, Crowley B. 2006. Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol* 78:485–493.
- Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM. 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 66:39–50.
- Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, Woodlee ES, Khalili K, Koralknik IJ. 2006. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol* 80:3495–3505.

- Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. 1980. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis* 142:1–8.
- Colovos C, Yeates TO. 1993. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* 2:1511–1519.
- Cubitt CL. 2006. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol* 577:85–95.
- Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198:59–70.
- Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, Atwood VJ. 2007. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* 81:11798–11808.
- Fedeles CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A. 1999. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods* 82:137–144.
- Garavelli PL, Boldorini R. 2002. BK virus encephalitis in an HIV-seropositive patient. Preliminary data. *Recenti Prog Med* 93:247.
- Godzik A. 1996. Knowledge-based potentials for protein folding: What can we learn from known protein structures? *Structure* 4:363–366.
- Godzik A, Kolinski A, Skolnick J. 1995. Are proteins ideal mixtures of amino acids? Analysis of energy parameter sets. *Protein Sci* 4:2107–2117.
- Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. 2008. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 205:841–852.
- Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* 106:129–132.
- Hix JK, Braun WE, Isada CM. 2004. Delirium in a renal transplant recipient associated with BK virus in the cerebrospinal fluid. *Transplantation* 78:1407–1408.
- Holm L, Park J. 2000. DALI: a webworkbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* 16:566–567.
- Ikegaya H, Saukko PJ, Tertti R, Metsarinen KP, Carr MJ, Crowley B, Sakurada K, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y. 2006. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *J Gen Virol* 87:3201–3208.
- Jaroszewski L, Pawlowski K, Godzik A. 1998. Multiple model approach: Exploring the limits of comparative modeling. *J Mol Model* 4:294–309.
- Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. 1993. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol* 41:11–17.
- Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Ward KH, Brown DW. 1995. Prevalence and distribution of BK virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by PCR-restriction enzyme analysis. *Clin Diagn Virol* 3:285–295.
- Jorgensen GE, Hammarin AL, Bratt G, Grandien M, Flaegstad T, Johnsen JJ. 2003. Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol* 70:14–19.
- Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5:e1000363.
- Krautkramer E, Klein TM, Sommerer C, Schnitzler P, Zeier M. 2009. Mutations in the BC-loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. *J Med Virol* 81:75–81.
- Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P. 2006. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol* 78:1588–1598.
- Krymskaya L, Sharma MC, Martinez J, Haq W, Huang EC, Limaye AP, Diamond DJ, Lacey SF. 2005. Cross-reactivity of T lymphocytes recognizing a human cytotoxic T-lymphocyte epitope within BK and JC virus VP1 polypeptides. *J Virol* 79:11170–11178.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26:283–291.
- Lesprit P, Chaline-Lehmann D, Authier FJ, Ponnelle T, Gray F, Levy Y. 2001. BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *AIDS* 15:1196–1199.
- Liddington RC, Yan Y, Moulay J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature* 354:278–284.
- Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356:83–85.
- Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS. 1991. BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65:4515–4519.
- Moen U, Johannessen M. 2008. Human polyomaviruses and cancer: Expanding repertoire. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:704–708.
- Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM. 1992. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12:345–364.
- Neu U, Stehle T, Atwood VJ. 2009. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384:389–399.
- Nukuzuma S, Takasaka T, Zheng HY, Zhong S, Chen Q, Kitamura T, Yogo Y. 2006. Subtype I BK polyomavirus strains grow more efficiently in human renal epithelial cells than subtype IV strains. *J Gen Virol* 87:1893–1901.
- Pawlowski K, Jaroszewski L, Bierzynski A, Godzik A. 1997. Multiple model approach—Dealing with alignment ambiguities in protein modeling. *Pac Symp Biocomput* 2:328–339.
- Pintar A, Carugo O, Pongor S. 2003. Atom depth in protein structure and function. *Trends Biochem Sci* 28:593–597.
- Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. 2002. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 73:1090–1094.
- Sapp M, Day PM. 2009. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* 384:400–409.
- Schneidawind D, Schmitt A, Wiesneth M, Mertens T, Bunjes D, Freund M, Schmitt M. 2010. Polyomavirus BK-specific CD8+ T cell responses in patients after allogeneic stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 51:1055–1062.
- Shah KV, Ozer HL, Ghazey HN, Kelly TJ, Jr. 1977. Common structural antigen of papovaviruses of the simian virus 40-polyoma subgroup. *J Virol* 21:179–186.
- Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC. 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369:160–163.
- Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC. 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4:165–182.
- Stoner GL, Alappan R, Jobs DV, Ryschewitsch CF, Landry ML. 2002. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am J Kidney Dis* 39:1102–1112.
- Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. 2009. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 5:e1000368.
- Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funyu T, Fujioka T, Omori S, Akiyama H, Chen Q, Zheng HY, Ohta N, Kitamura T, Yogo Y. 2004. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol* 85:2821–2827.
- Tornatore C, Berger JR, Houff SA, Curfman B, Meyers K, Winfield D, Major EO. 1992. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 31:454–462.
- Tremolada S, Akan S, Otte J, Khalili K, Ferrante P, Chaudhury PR, Woodlee ES, Trofe-Clark J, White MK, Gordon J. 2010a. Rare subtypes of BK virus are viable and frequently detected in renal transplant recipients with BK virus-associated nephropathy. *Virology* 404:312–318.
- Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R, Elia F, Gordon J, Ferrante P. 2010b. Mutations in the external loops of BK virus VP1 and urine viral load in renal transplant recipients. *J Cell Physiol* 222:195–199.
- Tremolada S, Delbue S, Larocca S, Carloni C, Elia F, Khalili K, Gordon J, Ferrante P. 2010c. Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus Res* 149:190–196.
- Vago L, Cinque P, Sala E, Nebuloni M, Caldarelli R, Racca S, Ferrante P, Trabottoni G, Costanzi G. 1996. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12:139–146.
- Vallbracht A, Lohler J, Gossmann J, Gluck T, Petersen D, Gerth HJ, Gencic M, Dorries K. 1993. Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol* 143:29–39.
- Vidal JE, Fink MC, Cedeno-Laurent F, Delbue S, Ferrante P, Dauar RF, Filho FB, Nogueira RS, Calore EE, Pannuti CS, Trujillo JR, de Oliveira AC. 2007. BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. *AIDS Res Ther* 4:13.
- Voltz R, Jager G, Seelos K, Fuhry L, Hohlfeld R. 1996. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol* 53:101–103.
- Yogo Y, Zhong S, Suzuki M, Shibuya A, Kitamura T. 2007. Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the family. *J Virol* 81:13254–13258.
- Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. 2007. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect* 9:204–213.
- Zhong S, Yogo Y, Ogawa Y, Oshiro Y, Fujimoto K, Kunitake T, Zheng HY, Shibuya A, Kitamura T. 2007a. Even distribution of BK polyomavirus subtypes and subgroups in the Japanese Archipelago. *Arch Virol* 152:1613–1621.
- Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. 2007b. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 45:193–198.

## 7.-DISCUSIÓN

A pesar que el BKPyV se asocia, generalmente, con patologías del tracto urogenital y el JCPyV con afecciones del SNC, la distinción entre los perfiles etiológicos de ambos virus no es absoluta. De hecho, se ha detectado excreción urinaria del JCPyV, tanto en individuos inmunocompetentes como en trasplantados renales y trasplantados de médula ósea [Egli et al., 2009; Gorczynska et al., 2005; Lopez et al., 2011]. Además, en determinados casos, la presencia del JCPyV en ausencia del BKPyV se ha relacionado con al desarrollo de cistitis hemorrágica y nefropatía intersticial [Drachenberg et al., 2007; Garcia Ligeró et al., 2002; Gorczynska et al., 2005; Kazory et al., 2003; Mischitelli et al., 2010].

Por su parte, el BKPyV se ha detectado en líquido cefalorraquídeo y cerebro de individuos inmunocompetentes y de pacientes inmunodeprimidos, principalmente VIH-positivos [Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Lesprit et al., 2001; Pietropaolo et al., 2003; Vago et al., 1996; Vallbracht et al., 1993; Voltz et al., 1996]. En algunos pacientes con infección neurológica por el BKPyV se han descrito cuadros clínicos entre los que destacan la encefalitis y la meningoencefalitis [Bratt et al., 1999; Lesprit et al., 2001; Vallbracht et al., 1993; Voltz et al., 1996]. Existen, asimismo, referencias de casos de LMP debidos al BKPyV [Cabrejo et al., 2005; Hix et al., 2004].

Además, el BKPyV y el JCPyV se han identificado de forma simultánea, en muestras de sangre y biopsias renales de pacientes con NAPV, mostrando que la co-reactivación de ambos virus es posible [Boldorini et al., 2009a; Drachenberg et al., 2007].

Por estas razones y como parte de la tesis doctoral de uno de los directores del presente trabajo, se diseñó una PCR convencional múltiple capaz de detectar de forma específica un fragmento común del antígeno T de los poliomavirus BK, JC y el SV40, en una sola reacción de amplificación [Fedele et al., 1999]. Dicha PCR se ha empleado como técnica diagnóstica del Laboratorio de Aislamiento y Detección Viral del CNM entre los años 1998 al 2011.

Como resultado del cribado simultáneo del BKPyV y del JCPyV, en las muestras pertenecientes a pacientes con patologías comunes a ambos virus, durante los años 1998 al 2010, se analizaron 2406 LCR y se identificaron 20 pacientes con patología neurológica asociada a la infección del BKPyV.

Es necesario aclarar que el presente trabajo no es un estudio epidemiológico en el que se hayan analizado de forma prospectiva aquellas muestras que, al cumplir unos determinados criterios fijados de antemano, hayan sido enviadas al CNM, por ser sospechosas de infección neurológica por el BKPyV. Muy al contrario, las muestras remitidas procedían de pacientes con sospecha de

infección del JCPyV asociada a LMP, quedando al juicio de cada clínico cuales son los requisitos de sospecha de LMP. Por lo tanto, la identificación accidental de los casos de infección neurológica por el BKPyV, se deben, únicamente, al empleo de una PCR múltiple que amplifica simultáneamente ambos virus.

Previamente a la publicación de los casos de infección neurológica por el BKPyV identificados en nuestro laboratorio, sólo existían referencias de 26 casos publicados por 17 laboratorios diferentes [Behre et al., 2008; Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Cabrejo et al., 2005; Ferrari et al., 2008; Friedman and Flanders, 2006; Garavelli and Boldorini, 2002; Hedquist et al., 1999; Hix et al., 2004; Jorgensen et al., 2003; Kinnaird and Anstead, 2010; Lesprit et al., 2001; Lopes da Silva, 2011b; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007; Voltz et al., 1996]. De hecho, el total de los 20 casos incluídos en nuestro estudio constituye, aún a día de hoy, el mayor tamaño muestral manejado por ningún grupo de investigación cuyo objeto de estudio haya sido la infección neurológica por el BKPyV.

Es probable que la escasez de casos disponibles en la literatura se debiera al desconocimiento de la relación entre el BKPyV y las patologías neurológicas, con lo que muchos de los casos podían estar infra-diagnosticándose [Lopes da Silva, 2011b]. A la luz de nuestros datos, se puede afirmar que es posible detectar ADN del BKPyV en el LCR de pacientes con síntomas neurológicos y que, por tanto, la infección neurológica debida al BKPyV puede ocurrir, no siendo tan infrecuente como previamente podía pensarse. Teniendo en cuenta que es una patología con graves consecuencias para los individuos inmunodeprimidos, parece importante caracterizarla adecuadamente [Lopes da Silva, 2011b].

Previamente a nuestro estudio, la patología neurológica asociada al BKPyV se había descrito, principalmente, en pacientes con SIDA [Bratt et al., 1999; Garavelli and Boldorini, 2002; Jorgensen et al., 2003; Kinnaird and Anstead, 2010; Lesprit et al., 2001; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007] y con enfermedades onco-hematológicas, como es el caso de los pacientes sometidos a tratamiento con quimioterapia o a trasplante de médula ósea [Behre et al., 2008; Ferrari et al., 2008; Lopes da Silva et al., 2011; Stoner et al., 2002]. Raramente, se ha identificado la infección del SNC por el BKPyV en pacientes inmunocompetentes [Behzad-Behbahani et al., 2003b; Behzad-Behbahani et al., 2004; Voltz et al., 1996].

Las patologías de base de los pacientes analizados en el presente trabajo coinciden, en general, con las descritas previamente. Trece de los 20 pacientes neurológicos son enfermos de SIDA y otros tres padecen patologías englobadas en la categoría de las onco-hematológicas, como son la leucemia mieloide crónica y la anemia Blackfan-Diamond (**Tabla 7.1.**). Sin embargo, uno de nuestros pacientes neurológicos padecía esclerosis múltiple (PN18), patología que, anteriormente,

no se había asociado a la infección neurológica debida al BKPyV. Se sabe que dicha paciente no había sido tratada con natalizumab. Finalmente, de uno de los pacientes (PN6) no nos constan antecedentes de inmunodepresión. Se trata de un hombre de 36 años que padece una encefalitis que podría estar asociada a una primoinfección con el virus aunque nos faltan datos serológicos para saberlo a ciencia cierta. Existen referencias de otro caso muy similar, un individuo inmunocompetente de 34 años con una encefalitis asociada a la infección neurológica por el BKPyV [Voltz et al., 1996].

**Tabla 7.1.-** Detección de la región reguladora y de la proteína VP1 del BKPyV, de la presencia de herpesvirus y enterovirus y cuantificación de la carga del BKPyV y el JCPyV en las muestras de pacientes neurológicos

Pacientes	Cuadro clínico	Muestra	Fecha de muestreo	PCR NCCR <sup>o</sup> BKPyV	PCR VP1 <sup>§</sup> BKPyV	Carga del BKPyV <sup>¶</sup> (copias/ml)	PCR otros virus*
PN1 (H, 32) <sup>#</sup>	VIH; meningitis	LCR1 <sup>¶</sup>	22/04/1998	N <sup>‡</sup>	N.D. <sup>o</sup>		N
		LCR2	08/02/1999	WWM <sup>¶</sup>	I, referencia	8.667 ± 1.985	HHV
PN2 (H, 26)	VIH; encefalitis	LCR	19/06/2000	WWM	I, referencia	2.472 ± 566	N
PN3 (H, 19)	Leucemia mieloide crónica; TMO <sup>§</sup> ; CH <sup>¶</sup> ; meningoencefalitis	LCR1	13/06/2001	WWM3	N	5.001 ± 1.145	HHV-6
		suero1	13/06/2001	N			
		LCR2	13/07/2001	N			N
		suero2	13/07/2001	N			
		LCR3	17/07/2001	N			N.D.
		suero3	17/07/2001	N			
		suero4	20/07/2001	N			
		suero5	30/07/2001	N			
PN4 (H, 56)	VIH	LCR	28/11/2001	WWM3	I, referencia	BKPyV: 12.346 ± 2.827; JCPyV: 3.146 ± 683	JCPyV
PN5 (M, 47)	VIH; neuropatía; astrocitoma cerebral y muerte	LCR1	18/01/2002	RR <sup>‡</sup> A	II, variante 1	1.886.509 ± 432.011	HHV-4
		LCR2	25/02/2002	RRA	I, referencia	128.182 ± 29.354	N.D.
		suero	25/02/2002	WWM4	N		
		sangre	25/02/2002	N	N		
PN6 (H, 36)	Inmunocompetente, encefalitis	LCR1	28/02/2002	WWM	N	N.D.	N
		suero1	28/02/2002	N			
		LCR2	14/03/2002	N			N
PN7 (H, 68)	Immunodeprimido VIH-negativo; fiebre y desorientación	suero2	14/03/2002	N			
		LCR	14/03/2002	RRB	N	N.D.	N
PN8 (M, 73)	Cáncer de mama; LMP <sup>¶</sup>	LCR	09/08/2002	WWM	I, referencia	607 ± 139	N
		suero	09/08/2002	WWM2	I, variante 2		

Pacientes	Cuadro clínico	Muestra	Fecha de muestreo	PCR NCCR <sup>©</sup> BKPyV	PCR VP1 <sup>§</sup> BKPyV	Carga del BKPyV <sup>€</sup> (copias/ml)	PCR otros virus*
PN9 (M, 13)	Leucemia mieloide crónica; estatus convulsivo; CH	6 sueros (1-6)	10/05/2002-31/10/2002	N	N.D.		
		LCR	19/11/2002	WWM	I, referencia	N.D.	N
		suero7	19/11/2002	N	N.D.		
PN10 (M, N.D.)	VIH; LMP	LCR	02/12/2003	WWM	I, referencia	N.D.	HHV-4, HHV-5
PN11 (H, N.D.)	VIH; LMP	LCR	27/01/2004	RRC	I, referencia	N.D.	N
PN12 (H, 37)	VIH; linfoma cerebral	LCR	12/02/2004	RRD	I, referencia	N.D.	N
PN13 (M, 5)	Anemia Blackfan-Diamond; encefalopatía; TMO ; CH	LCR	23/03/2004	WWM5	I, referencia	N.D.	N
		suero1	23/03/2004	N	N.D.		
		suero2	12/04/2004	WWM6	I, referencia		
		suero3	13/04/2004	WWM6	N		
		2 sueros (4-5)	14/07/2006-21/03/2007	N	N.D.		N
PN14 (H, N.D.)	VIH; LMP	LCR	11/10/2004	WWM	N	N.D.	N
PN15 (H, N.D.)	VIH; LMP	LCR	10/01/2005	WWM3	N	BKPyV: 1.927 ± 441;	JCPyV
						JCPyV: 2.769 ± 601	
PN16 (M, 44)	VIH; encefalopatía	LCR	01/04/2005	WWM	I, variante 3	N.D.	N
PN17 (H, 48)	VIH; encefalopatía	LCR1	13/06/2005	RRE	N	N.D.	N
		LCR2	20/06/2005	RRE	N	214.787 ± 49.186	N
		Suero	20/06/2005	N			
PN18 (M, 52)	Esclerosis múltiple	LCR	10/05/2007	WWM7	I, variante 4	N.D.	HHV-4
PN19 (H, 43)	VIH; encefalopatía	LCR	19/09/2007	WWM	I, referencia	N.D.	N
PN20 (H, 45)	VIH; LMP	LCR1	14/12/2010	RRF	N.D.	6.743.099 ± 1.544.170	N
		LCR2	30/12/2010	RRF	N.D.	4.263.991 ± 976.454	N

<sup>©</sup> Arquitectura de la región reguladora del BKPyV. Los números de acceso en GenBank correspondientes a las secuencias son JQ513592-JQ513621.

<sup>§</sup> Subtipo del BKPyV y patrón de mutaciones de VP1. Los números de acceso en GenBank correspondientes a las secuencias son JX195557-JX195583.

<sup>€</sup> Cargas del BKPyV y del JCPyV en LCR cuantificadas mediante PCR a tiempo real. A la cantidad absoluta obtenida se le ha aplicado el valor del correspondiente coeficiente de variabilidad interensayo (BKPyV, 22,9%; JCPyV, 21,7%).

\* La detección de otros posibles virus presentes en el líquido cefalorraquídeo se llevó a cabo mediante dos PCR convencionales múltiples. Una de las mismas amplifica el BKPyV, el JCPyV y el SV40 [Fedele et al., 1999] y la otra detecta enterovirus y herpesvirus humanos: el virus herpes simple (HHV), el virus varicela zoster, el citomegalovirus (HHV-5), el virus herpes 6 (HHV-6), el virus Epstein-Barr (HHV-4) y enterovirus humanos [Casas et al., 1997].

# Sexo y edad

<sup>¶</sup> LCR: líquido cefalorraquídeo

<sup>¥</sup> N: negativo

<sup>º</sup> N.D.: no disponible

<sup>&</sup> WWM: variantes cuya región reguladora es arquetípica a excepción de mutaciones puntuales o inserciones o deleciones de un nucleótido

<sup>§</sup> TMO: trasplantado de medula ósea

<sup>@</sup> CH: cystitis hemorrágica

<sup>≠</sup> RR: variantes cuya región reguladora es reorganizada ya que contienen duplicaciones y deleciones de más de un nucleótido en la región reguladora

<sup>></sup> LMP: leucoencefalopatía multifocal progresiva

Los presentación clínica más comúnmente asociada a la infección neurológica del BKPyV es la encefalitis seguida de la meningitis y de la meningoencefalitis [Behzad-Behbahani et al., 2003a; Behzad-Behbahani et al., 2003b; Bratt et al., 1999; Garavelli and Boldorini, 2002; Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002; Vallbracht et al., 1993; Vidal et al., 2007]. La LMP sólo se ha descrito, anteriormente, en un trasplantado renal y en un paciente sometido a tratamiento con esteroides [Cabrejo et al., 2005; Hix et al., 2004].

Sorprendentemente, en nuestro estudio, los pacientes con infección neurológica por el BKPyV tenían un diagnóstico presuntivo de LMP (seis pacientes) y otros tipos de encefalopatías (cuatro casos). En el LCR de uno de dichos pacientes con diagnóstico presuntivo de LMP, también se detectó JCPyV (PN15) pero no en los restantes casos. Los pacientes PN2 y PN6 tenían un diagnóstico presuntivo de encefalitis mientras que en los pacientes PN1 y PN3 se diagnosticó meningitis y meningoencefalitis, respectivamente.

En dos de los pacientes neurológicos, se detectaron tumores cerebrales, en concreto un astrocitoma (PN5) y un linfoma cerebral (PN12). Aunque, el BKPyV, anteriormente, se ha relacionado con el desarrollo de este tipo de procesos oncogénicos, carecemos de la información necesaria para concluir que esté implicado en el origen de los mismos [Delbue et al., 2005a; White et al., 2005].

La detección de los casos de infección neurológica por el BKPyV sirvió para constatar la utilidad de las técnicas de detección múltiple de los poliomavirus humanos BKPyV y JCPyV. Por ello, se quiso mejorar la metodología disponible, y se diseñó y se puso a punto una técnica de PCR a tiempo real capaz de cuantificar la carga viral del BKPyV en el LCR de los pacientes neurológicos, ya que no existían datos al respecto. Se incluyó, además, un control interno con el fin de poder evitar los resultados falsos negativos.



Existen referencias de varias técnicas de PCR a tiempo real múltiple para los poliomavirus BK y JC capaces de discriminar la presencia de ambos virus, así como, de cuantificarlos de forma simultánea [Dumonceaux et al., 2008; Funahashi et al., 2010; Palmieri et al., 2010; Saundh et al., 2010] pero sólo una de las mismas incluye un control interno [Dumonceaux et al., 2008]. En todos estos métodos, se emplean dos parejas de cebadores para detectar, específicamente, el BKPyV y el JCPyV y, el único método que además contiene un control interno, requiere de una tercera pareja de cebadores para amplificar dicho control interno.

La PCR a tiempo real diseñada en el presente trabajo es la primera que requiere una sola pareja de cebadores degenerados para amplificar el BKPyV, el JCPyV y el control interno. Este tipo de aproximación en la que con una sola pareja de oligonucleótidos se cuantifica un control interno de concentración conocida y un fragmento a amplificar o varios cuya concentración se quiere determinar, se denomina cuantificación competitiva o co-amplificación. La cuantificación competitiva constituye una aproximación muy exacta a la cuantificación absoluta [Mackay, 2004].

La secuencia de los oligonucleótidos empleados, en nuestro método, es común a una PCR convencional anidada, previamente publicada, que amplifica un fragmento del antígeno T común al BKPyV y al JCPyV [Fedele et al., 2000]. Habida cuenta del tiempo transcurrido desde su diseño, la idoneidad de los cebadores para detectar todas las secuencias disponibles del BKPyV y del JCPyV se validó con alineamientos de secuencias de ambos poliomavirus extraídas de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

La detección específica de ambos virus y del control interno se consiguió, en la presente técnica, gracias a la inclusión de tres sondas, cada una de las cuales está marcada con un fluoróforo distinto (FAM, VIC y NED, respectivamente). Así, cada sonda se une exclusivamente a su correspondiente fragmento de amplificación, emitiendo fluorescencia en un canal de lectura diferente. Los mencionados alineamientos también se emplearon para confirmar que la sonda del BKPyV era capaz de unirse a todas las secuencias del BKPyV y a ninguna de las del JCPyV y a la inversa para la sonda del JCPyV.

Con el fin de cuantificar los genomas del BKPyV y del JCPyV, se generaron plásmidos que contenían las secuencias homólogas a los cebadores. Asimismo, el plásmido del BKPyV, internamente a dichas secuencias, contiene las secuencias homólogas a la sonda del BKPyV y el plásmido del JCPyV, las secuencias homólogas a su correspondiente sonda. El diseño del plásmido del control interno se tomó de la PCR convencional para el BKPyV y el JCPyV previamente mencionada [Fedele et al., 2000].

La eficiencia y la variabilidad intra e interensayo de las curvas patrón empleadas en la cuantificación se valoraron al analizar por triplicado las diluciones comprendidas entre  $10^7$  a  $10$

copias de ambos plásmidos, en tres días consecutivos, obteniéndose resultados óptimos. Los ensayos demostraron ser lineales entre los límites de la curva patrón, es decir, entre  $10^7$  y 10 copias por reacción. Además, el límite de detección, tanto para el plásmido del BKPyV como para el del JCPyV, se fijó en diez copias ya que era la mínima cantidad de ambos plásmidos que pudo detectarse, de forma consistente, en todos los ensayos. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos para otra PCR a tiempo real capaz de cuantificar de forma específica ambos virus [Palmieri et al., 2010] y mejoran los conseguidos para la única técnica de estas características con control interno. En dicho método el límite de detección para el BKPyV se fijó en 50 copias [Dumonceaux et al., 2008]. De hecho, parece que la inclusión de un control interno puede disminuir la sensibilidad de los ensayos de PCR a tiempo real [Espy et al., 2006]. Sin embargo, nuestra técnica demostró una sensibilidad máxima para ambos virus, lo cual puede deberse a que no precisa de la inclusión de varias parejas de cebadores y, así, se evitan interacciones no deseadas.

Asimismo, se demostró de forma empírica que cada sonda detectaba de forma específica su correspondiente plásmido al analizar por separado cada uno de los plásmidos (BKPyV y alternativamente JCPyV) en ensayos múltiples que incluían todas las sondas y obtenerse señal, únicamente, en el canal esperado.

Una vez validadas las curvas patrón, el método desarrollado se sometió a un análisis de control de calidad mediante un panel correspondiente a un ensayo intralaboratorio internacional para el diagnóstico molecular del BKPyV y del JCPyV del año 2010 (Quality Control for Molecular Diagnostics, QCMD2010). Dicho control de calidad está organizado por las Sociedades Europeas de Virología Clínica y de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas y goza de prestigio internacional.

De acuerdo al informe oficial emitido por los organizadores, los resultados cualitativos del análisis fueron “muy satisfactorios”, para ambos virus, ya que, en todas las muestras, la técnica fue capaz de detectar de forma específica tanto el BKPyV como el JCPyV. Por su parte, los resultados cuantitativos fueron “muy satisfactorios” para el BKPyV ya que los valores de carga viral obtenidos, para todas las muestras, mediante la PCR a tiempo real, se encontraban entre la media determinada por el control de calidad y una desviación estándar. Asimismo, los resultados cuantitativos fueron “satisfactorios” para el JCPyV ya que los datos de cuantificación obtenidos mediante la PCR a tiempo real se situaban entre una y dos desviaciones estándar respecto de la media del control de calidad para todas las muestras menos dos.

Gracias a la evaluación llevada a cabo mediante el citado control de calidad, la sensibilidad con muestras de la PCR a tiempo real se fijó en 100 copias/ml para el BKPyV y en 264 copias/ml para

el JCPyV. Dichas concentraciones fueron las cargas virales más bajas que se tiene certeza que se pueden detectar por estar presentes en muestras del control de calidad.

La variabilidad intra e interensayo de la PCR a tiempo real se valoró con dos muestras de sangre positivas al BKPyV y dos LCR positivos al JCPyV cuyo ADN se extrajo en cuatro días diferentes. La carga viral del ADN extraído en un mismo día o en días diferentes y de sus réplicas se cuantificó, en cuatro días consecutivos. Para el BKPyV y el JCPyV, se obtuvieron valores máximos del coeficiente de variación intraensayo del 17,5% y del 21,2%, respectivamente, y del coeficiente de variación interensayo, del 22,9% y del 21,7%, respectivamente.

Una de las principales aplicaciones de la cuantificación de los poliomavirus humanos, es la monitorización de la carga viral del BKPyV en trasplantados renales con NAPV [Bechert et al., 2010; Hirsch et al., 2005]. Para poder considerar, adecuadamente, si existe variación real entre estimaciones de la carga viral del BKPyV, en muestras tomadas en diferentes momentos temporales para un mismo paciente, es imprescindible tener en cuenta la variabilidad intra e interensayo y los intervalos de confianza. Sin embargo, con respecto a las técnicas capaces de cuantificar BKPyV y JCPyV de forma específica y simultánea, sólo en la PCR descrita por Funahashi y colaboradores se ha estimado el valor de la reproducibilidad intra e interensayo con muestras clínicas [Funahashi et al., 2010] y ese mismo dato suele estar ausente de la información proporcionada por los métodos comerciales [Rubio et al., 2010].

Existe, además, otra limitación a la cuantificación absoluta de la carga viral de los poliomavirus humanos y es la ausencia de patrones universales de concentración conocida [Bechert et al., 2010]. Actualmente, la carga viral del BKPyV y del JCPyV se determina por comparación con curvas patrón generadas mediante diluciones de plásmidos. Mientras que los plásmidos no se someten al proceso de extracción de ADN, la eficiencia y reproducibilidad de la extracción del ADN de los poliomavirus humanos presentes en las muestras clínicas se ven comprometidas por la estructura superenrollada del genoma de los mismos y porque el virión es sumamente resistente [Imperiale, 2007; Laghi et al., 2004; Weil and Vinograd, 1963]. Por todo lo anterior, los datos referentes a la cuantificación del BKPyV y del JCPyV no son sino una aproximación sujeta a diversas fuentes de incertidumbre, por lo que no pueden considerarse de forma absoluta hasta que no existan unos patrones oficiales cuya concentración se conozca.

La PCR a tiempo real descrita, en el presente estudio, se sometió al análisis con muestras control que permitió comprobar que la técnica detecta, específicamente, los poliomavirus BKPyV y JCPyV, y no otros virus. Se demostró que con muestras clínicas que contenían virus relacionados filogenéticamente, como los papilomavirus humanos, u otros virus asociados a pacientes inmunodeprimidos, como los herpes o los enterovirus humanos, no se obtenía amplificación. Las

muestras provenientes de individuos inmunocompetentes sin sospecha de infección por poliomavirus humanos también resultaron negativas.

La presente técnica se validó, asimismo, con un panel muy completo de muestras clínicas de pacientes con diferentes patologías asociadas a la infección por poliomavirus humanos. En concreto, se analizaron sangres y orinas de trasplantados renales con sospecha de NAPV y LCRs de pacientes con sospecha de LMP incluyendo pacientes VIH-positivos, pacientes con esclerosis múltiple en tratamiento con natalizumab y pacientes VIH-negativos. Para nuestro conocimiento, ninguna de las PCR a tiempo real múltiplex para el BKPyV y el JCPyV descritas ha sido evaluada con un panel tan completo.

A través del análisis con las muestras clínicas, la PCR a tiempo real demostró ser eficiente, específica y, en general, más sensible que la técnica convencional. Todas las muestras positivas se confirmaron mediante la PCR a tiempo real pero, además, se detectaron muestras positivas adicionales que incluían sangres de trasplantados renales y LCRs pertenecientes a pacientes VIH-positivos y a pacientes con esclerosis múltiple tratados con natalizumab.

La detección de diez nuevas muestras de sangre positivas al BKPyV provenientes de cinco trasplantados renales permitió una aproximación más precisa a la evolución de la presencia del BKPyV en la sangre de dichos pacientes. En los cinco pacientes, se comprobó que el periodo de viremia era más largo de lo que previamente parecía y, en dos de los mismos, se logró una detección precoz de la presencia del BKPyV en sangre.

De haberse tratado de un estudio prospectivo, estos datos podrían haber servido para mejorar la toma de decisiones en el manejo de los pacientes por parte de los clínicos. En el periodo de cribado de la NAPV, una pronta identificación de la presencia del BKPyV en sangre es fundamental para llevar a cabo una intervención terapéutica adecuada que evite el rechazo del órgano trasplantado, ya que la viremia predice el deterioro renal [Hirsch et al., 2002; Nickeleit et al., 2000; Ramos et al., 2009]. Asimismo, una vez que la NAPV comienza a ser tratada, es importante saber con certeza si el BKPyV, realmente, ha desaparecido de la sangre, ya que uno de los criterios para determinar que la patología se ha resuelto es el resultado negativo de la PCR del BKPyV en sangre [Hirsch et al., 2005; Ramos et al., 2009].

Por otro lado, en diez muestras de orina provenientes de trasplantados renales, en las que, previamente mediante PCR convencional se había detectado coinfección de BKPyV y JCPyV, sólo se identificó infección debida a uno de los dos virus. No se puede descartar que se tratara de falsos dobles positivos de la PCR convencional ya que, aunque ambas técnicas comparten cebadores, la PCR a tiempo real, al emplear sondas para discriminar ambos virus, es más específica [Espy et al., 2006]. Este fenómeno de falsos dobles positivos ha sido observado previamente por Dumonceaux y

colaboradores al describir otra PCR a tiempo real múltiple para el BKPyV y el JCPyV [Dumonceaux et al., 2008]. Por otra parte, el único caso de coinfección en sangre observado en nuestro estudio se confirmó mediante la PCR a tiempo real.

Gracias a la mayor sensibilidad de la técnica desarrollada, también, se pudieron identificar cinco nuevos casos de infección neurológica debida a poliomavirus humanos, cuatro de los mismos asociados al JCPyV y el restante, al BKPyV. Todos los casos de pacientes en tratamiento con natalizumab se detectaron únicamente mediante PCR a tiempo real. En estos pacientes, se detectaron cargas virales muy bajas y menores de 500 copias/ml corroborando los valores obtenidos por Clifford y colaboradores [Clifford et al., 2010]. Las bajas cargas virales detectadas ponen de manifiesto la gran sensibilidad de la técnica desarrollada y la importancia de disponer de técnicas muy sensibles en el diagnóstico de este tipo de infecciones.

Por primera vez, se han proporcionado datos sobre la cuantificación del BKPyV en el LCR de ocho de los 20 pacientes neurológicos, observándose una mediana de la carga viral en torno a las  $9 \times 10^3$  copias/ml, con un rango aproximado entre  $6 \times 10^2$  y  $2 \times 10^6$  copias/ml.

La carga viral del JCPyV en el LCR de pacientes con sospecha de LMP incluyendo pacientes VIH-positivos, VIH-negativos y pacientes tratados con natalizumab, presentó un valor de la mediana de  $10^5$  copias/ml con un rango de entre  $2 \times 10^2$  y  $6 \times 10^6$  copias/ml. Parece, por tanto, que existe una tendencia a que la carga viral del JCPyV en LCR sea mayor que la del BKPyV pero las diferencias no son estadísticamente significativas. Por otra parte, es difícil conocer la significación biológica de las diferencias en la carga viral entre ambos virus presentes en el LCR de pacientes neurológicos; ya que el JCPyV es un virus eminentemente neurotrópico y adaptado a replicar en células gliales [Major et al., 1985; White et al., 2009] y el BKPyV presenta un tropismo más marcado por el tracto urogenital [Doerries, 2006; Shinohara et al., 1993].

Finalmente, dado que entre las muestras clínicas analizadas existían muestras positivas a todos los subtipos del BKPyV (I-IV), se demostró, empíricamente, que la presente técnica es capaz de detectar y cuantificar todos los subtipos del BKPyV. En el caso del JCPyV, sólo se conocía el subtipo de las cepas incluídas en el panel del control de calidad (1A). Por ello, la capacidad de la técnica para detectar todos los subtipos disponibles de dicho virus se validó de forma teórica alineando los cebadores y las sondas con 280 secuencias del genoma completo de todos los subtipos del JCPyV (1-8) que se obtuvieron de GenBank. Se observó que tanto los cebadores como las sondas eran perfectamente complementarios al 93,2% de las secuencias, las cuales pertenecían a todos los subtipos conocidos del JCPyV. No se detectaron desapareamientos importantes que afectaran al extremo 3'. La presente técnica es la primera PCR a tiempo real

múltiple para el BKPyV y el JCPyV que demuestra su capacidad para detectar todos los subtipos conocidos de ambos poliomavirus.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que el método aquí descrito ha sido validado de forma inusualmente exhaustiva. Debido a los resultados positivos de la evaluación, a comienzos del año 2011, la técnica se incorporó a la cartera de servicios del CNM. La PCR a tiempo real desarrollada sustituyó a la PCR convencional múltiple que se empleaba previamente, suponiendo una mejora en el servicio al Sistema Nacional de Salud.

Por otro lado, debido a la escasez de casos de infección neurológica por el BKPyV descritos, al comenzar este trabajo de tesis doctoral, no se disponía de apenas datos que pudieran ayudar a esclarecer si existen determinantes patogénicos que doten a las cepas neurológicas de una especial capacidad para invadir el SNC.

La única información disponible, al respecto, procedía de dos estudios independientes cada uno de los cuales describía un caso de un paciente inmunodeprimido con meningoencefalitis y NAPV asociadas a la infección por el BKPyV. Uno de dichos pacientes era un enfermo de leucemia en tratamiento con corticoides y el otro padecía SIDA. En ambos estudios, se detectaron cepas reorganizadas del BKPyV, exclusivamente en el líquido cefalorraquídeo y tejidos del SNC, mientras que aquellas detectadas en la orina y los linfocitos de la sangre periférica presentaban una conformación arquetípica [Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002].

Por ello, la existencia de reorganizaciones en la región reguladora se relacionó con que las cepas poseedoras de las mismas estuviesen más adaptadas al SNC y diesen lugar a patologías neurológicas [Jorgensen et al., 2003; Lopes da Silva, 2011b]. En el contexto de la NAPV, la enfermedad más comúnmente asociada al BKPyV, las reorganizaciones en la región reguladora del BKPyV se han relacionado con una mayor expresión de los genes tempranos así como con una mayor capacidad replicativa y citopática [Gosert et al., 2008].

Además, en el caso del JCPyV, previamente al desarrollo de la presente tesis, ya se conocían determinantes patogénicos presentes en el genoma del mismo. Las reorganizaciones en la región reguladora parecen determinar el neurotropismo de determinadas cepas que invaden el SNC y dan lugar a LMP [Marshall and Major, 2010; White and Khalili, 2011]. Esta capacidad neurotrópica podría deberse a la mayor capacidad replicativa y de expresión de los genes tempranos observadas en dichas variantes reorganizadas [Gosert et al., 2010].

Asimismo, se han detectado cambios aminoacídicos en la proteína VP1 específicos de los pacientes con LMP. Dichos cambios se han relacionado con una mayor capacidad patogénica del virus al

eliminarse la unión del mismo a los receptores de las células periféricas del hospedador [Gorelik et al., 2011].

Por todo ello, se planteó el objetivo de caracterizar las variantes neurológicas del BKPyV con respecto a la posible existencia de determinantes patogénicos presentes en la proteína VP1 y/o en la región reguladora semejantes a los del JCPyV.

En nuestro estudio, se logró determinar la secuencia de la región reguladora del BKPyV en el LCR de los 20 pacientes neurológicos, la cual se comparó con la secuencia obtenida en trasplantados renales, trasplantados de médula ósea y embarazadas, con el fin de evaluar si existen cepas neurotrópicas del BKPyV caracterizadas por la presencia de reorganizaciones en la región reguladora.

En el LCR de seis pacientes neurológicos, entre los que se incluían los pacientes VIH-positivos PN5 (RRA), PN11 (RRC), PN12 (RRD), PN17 (RRE) y PN20 (RRF) y el paciente inmunodeprimido y VIH-negativo PN7 (RRB) se detectaron variantes reorganizadas (RRA-RRF) (**Tabla 7.1.**). Las variantes reorganizadas RRA (OPQRΔS), RRB (OΔPΔQRΔS), RRF (OPQRΔSΔ) mostraron una conformación linear, aunque con deleciones de uno o más bloques, mientras que las variantes RRC (OPQRPQRS), RRD (OPPQRS) y RRE (OPQPQRS) presentaban una conformación no linear debido a la presencia de deleciones y a duplicaciones de parte de los bloques o de bloques enteros.

El resto de variantes reorganizadas se identificaron en el grupo de los trasplantados renales (RRG-RRM) y en una trasplantada de médula ósea (RRL). Curiosamente, las variantes RRI y RRJ, presentes en la sangre de dos trasplantados diferentes mostraron idéntica secuencia, caracterizada por poseer una delección de los nucleótidos 32-49 del bloque P, a excepción de una mutación puntual. Olsen y colaboradores analizaron esta variante en células Vero demostrando que la expresión de las proteínas de la misma es similar a la de WW. En dicho estudio, la citada variante también fue detectada en dos trasplantados renales diferentes. Carr y colegas la identificaron en un trasplantado de médula ósea [Carr et al., 2006; Olsen et al., 2009].

En el LCR de los 14 restantes pacientes neurológicos, se identificó la cepa arquetípica la cual fue, asimismo, la más frecuente en el resto de pacientes y controles. Las diferentes cepas arquetípicas se clasificaron en 17 variantes diferentes (WWM-WW17), en función de las mutaciones puntuales observadas con respecto a la cepa de referencia WW [Moens and Van Ghelue, 2005].

Las variantes WWM a WWM7 se detectaron tanto en el LCR de pacientes neurológicos como en muestras de otros pacientes, a excepción de las variantes WWM5, WWM7 y WWM4, las cuales se identificaron, exclusivamente, en el LCR de PN13, PN18 y en el suero de PN5, respectivamente.

La variante WWM fue la más común en todos los grupos de pacientes y se detectó en el LCR de nueve pacientes neurológicos.

En el grupo de las embarazadas, sólo se identificó la variante WWM17, hallazgo que confirma estudios previos en los que se ha visto que la única cepa que se excreta en la orina de las embarazadas sanas es la arquetípica [Bhattacharjee and Chakraborty, 2004; Chang et al., 1996b; Markowitz et al., 1991]. Teniendo en cuenta que dicha variante había sido previamente identificada en la orina de un grupo de pacientes de Tromsø (Noruega) y que las embarazadas de este estudio también proceden de Noruega, en concreto de Tromsø y Stavanger, se podría pensar que WWM17 circula en las mencionadas poblaciones noruegas.

Dado que en el LCR de la mayoría de los pacientes neurológicos (14 de 20) se identificaron variantes arquetípicas, parece que la presencia de reorganizaciones en la región reguladora no es un prerequisite para la replicación del BKPyV en el SNC y el desarrollo de patología neurológica. Asimismo, la anatomía de la región reguladora de las variantes reorganizadas observadas en los pacientes neurológicos (RRA a RRF) es similar a la de otras cepas previamente publicadas detectadas en muestras no procedentes del SNC [Boldorini et al., 2005a; Broekema et al., 2010; Carr et al., 2006; Chen et al., 2001; Degener et al., 1999; Gosert et al., 2008; Li et al., 2002; Negrini et al., 1991; Olsen et al., 2006; Perets et al., 2009; Pietropaolo et al., 1998a; Stoner et al., 2002; Sugimoto et al., 1989; Sundsfjord et al., 1990; Takasaka et al., 2004; Vera-Sempere et al., 2006; Vera-Sempere et al., 2005; Yogo et al., 2008a]. Finalmente, aunque las reorganizaciones parece ser más frecuente en los pacientes neurológicos (30%) que en los trasplantados (16%) y que en las embarazadas (0), las diferencias no son significativas.

Estos resultados contradicen lo propuesto para los dos pacientes neurológicos con variantes reorganizadas en SNC previamente descritos, para los que se había planteado una implicación de las variantes reorganizadas en el inicio de la patología neurológica [Jorgensen et al., 2003; Stoner et al., 2002]. Tampoco coinciden con lo observado para la patogenia de la LMP, en la que cepas del JCPyV con conformación reorganizada parecen ser determinantes en el desarrollo de la enfermedad [Marshall and Major, 2010; Vaz et al., 2000; White and Khalili, 2011].

Sin embargo, las conclusiones de nuestro estudio sí son similares a las obtenidas en trabajos previos para otras patologías asociadas al BKPyV, como la NAPV y la cistitis hemorrágica [Anzivino et al., 2011; Boldorini et al., 2009a; Boldorini et al., 2005b; Carr et al., 2006; Olsen et al., 2006; Randhawa et al., 2003; Sharma et al., 2007]. Aunque, en algunos de los pacientes se detectaron formas reorganizadas, la mayor parte de los mismos presentaban variantes arquetípicas del BKPyV. Asimismo, las formas reorganizadas no se identificaron exclusivamente en condiciones patológicas sino que también estaban presentes en los controles incluídos en los



mencionados estudios [Boldorini et al., 2009a; Carr et al., 2006; Olsen et al., 2006; Sharma et al., 2007].

Por otra parte, para los pacientes neurológicos PN5, PN17, PN20 en los que se identificaron las variantes reorganizadas RRA, RRE y RRF, respectivamente, se disponía de varias muestras de LCR de seguimiento. En todos ellos, se vio persistencia en SNC de las respectivas variantes reorganizadas de entre una semana (RRE) y algo más de un mes (RRA).

Además, para siete pacientes neurológicos, se contaba con muestras de suero tomadas en la misma fecha que las correspondientes muestras de LCR positivas. En cinco de estos pacientes (PN3, PN6, PN9, PN13, PN17) no se logró amplificar el BKPyV en suero mientras que en los dos pacientes restantes (PN5, PN8) se identificaron formas arquetípicas cuya secuencia difería de la detectada en LCR. En la paciente PN13, una niña trasplantada de médula ósea, el suero pareado al correspondiente LCR positivo al BKPyV resultó negativo. Sin embargo, el BKPyV se logró amplificar a partir dos muestras de suero posteriores, mostrando, en ambos casos, conformación arquetípica e idéntica secuencia. Como en los casos anteriores, la secuencia identificada en el LCR de PN13 difería de la detectada en suero. No se logró detectar ADN del BKPyV en suero el único paciente (PN9) para el que se disponían de muestras de suero tomadas previamente al correspondiente LCR positivo.

A tenor de estos resultados, parece poco probable que el tropismo del BKPyV en la infección neurológica sea similar al observado para el JCPyV en la LMP. En los pacientes con LMP asociada a la infección por el JCPyV, se observan formas reorganizadas, en los linfocitos de sangre periférica, las cuales están asociadas al desarrollo de LMP en dichos pacientes [Delbue et al., 2005b; Marzocchi et al., 2008]. Estas células no sólo están implicadas en la latencia del virus sino que permiten al JCPyV circular por el cuerpo y llegar al cerebro [Dolei et al., 2000; Dorries et al., 1994; White and Khalili, 2011]. En pacientes con LMP, las secuencias de la región reguladora, en muestras simultáneas de LCR y suero, son muy similares presentando reorganizaciones, en ambos casos, y observándose un incremento de las mismas en el tránsito del virus del plasma al LCR [Delbue et al., 2005b; Gosert et al., 2010].

Con respecto al BKPyV, como se ha explicado anteriormente, en la mayor parte de los casos, es indetectable en el suero de los pacientes neurológicos, a pesar de estar presente en muestras de LCR tomadas en la misma fecha o en fechas posteriores. Además, en aquellos sueros que eran positivos al BKPyV, se observaron cepas arquetípicas del BKPyV cuya secuencia difiere de aquellas identificadas en LCR. Por tanto, no parece probable que variantes del BKPyV presentes en el plasma de los pacientes neurológicos hayan atravesado la barrera hematoencefálica dando lugar a patología neurológica.

Por supuesto, no se puede descartar que el BKPyV haya llegado al SNC por vía hemática para, posteriormente, desaparecer del suero y que las secuencias discordantes entre LCR y suero se deban a una adaptación del virus a los genes específicos del SNC. Bien es cierto que, en la única paciente para la que se disponía de muestras de suero previas a la identificación del BKPyV en LCR, no se observó la presencia del virus en dicho fluido.

Existen diferencias significativas en la región reguladora del BKPyV y el JCPyV que podrían determinar el diferente tropismo de ambos virus. En el caso del JCPyV, la duplicación del elemento de 98 pares de bases presente en la cepa Mad-1, variante reorganizada prototípica, determina, al menos, en parte el tropismo del virus por las células gliales y la restricción de la replicación a astrocitos y oligodendrocitos [Kenney et al., 1984; White et al., 2009]. Existen factores de transcripción que activan positivamente la transcripción del virus en células gliales, como NF-1X y Tst-1, y factores que reprimen la transcripción del virus en células no gliales [Beggs et al., 1988; Sumner et al., 1996; Wegner et al., 1993]. Sin embargo, no está claro que un elemento equivalente esté presente en el BKPyV.

Una explicación más plausible para la infección neurológica debida al BKPyV en los pacientes de nuestro estudio sería una reactivación local del BKPyV latente en el cerebro de los mencionados pacientes. Dicha reactivación podría tener lugar de forma independiente a la reactivación a nivel renal, lo cual explicaría el porqué de la no coexistencia del virus en suero y LCR o la diferencia entre las secuencias detectadas en ambos compartimentos para aquellos pacientes en los que se ha observado infección simultánea de LCR y suero. La latencia del BKPyV es controvertida pero existen estudios que demuestran que el BKPyV sí está presente en el cerebro de individuos sanos [Elsner and Dorries, 1992; Pietropaolo et al., 2003].

En cualquier caso, la información obtenida en el presente estudio no es suficiente para concluir que el BKPyV se haya reactivado en SNC de forma independiente a otros sitios de latencia y estudios complementarios serían necesarios para esclarecer el mecanismo de patogenia del virus.

Con respecto a la proteína VP1 del BKPyV presente en el SNC de pacientes neurológicos, previamente a nuestro estudio, sólo se conocía una parte de la secuencia de la misma (nucleótidos 1657 al 2019) obtenida a partir de un único paciente con leucemia y sometido a tratamiento con quimioterapia [Stoner et al., 2002]. En este trabajo de tesis doctoral, se ha presentado la secuencia completa de la proteína VP1 del BKPyV identificada en el LCR de 14 de los 20 pacientes neurológicos. Además, con el objeto de determinar si existen variantes neurotrópicas caracterizadas por pertenecer a un subtipo determinado del BKPyV o por poseer cambios aminoacídicos específicos en VP1, se compararon las secuencias obtenidas en los pacientes neurológicos con otras de trasplantados renales, trasplantados de médula ósea y embarazadas sanas.

El resultado de nuestro análisis fue que la distribución coincide con la observada en trabajos anteriores para la población general, incluyendo individuos inmunocompetentes, trasplantados renales con y sin NAPV y trasplantados de médula ósea con y sin CH [Baksh et al., 2001; Carr et al., 2006; Ikegaya et al., 2006; Jin et al., 1995; Krumbholz et al., 2006; Takasaka et al., 2004; Yogo et al., 2007; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2007a]. El subtipo I fue el más prevalente en todos los grupos de pacientes e individuos sanos, constituyendo el 93% del total. Dicho subtipo se detectó en los todos los pacientes neurológicos y, solamente, en el paciente neurológico 5, se identificó, además, el subtipo II en una muestra de LCR previa.

El subtipo II también se observó en diversas muestras de orina y sangre de una paciente trasplantada de médula ósea. Los subtipos III y IV se identificaron en la orina de una trasplantada de médula ósea y en la sangre de dos trasplantados renales, respectivamente. La variabilidad en la distribución de los subtipos podría verse afectada por la diferente capacidad replicativa asociada a los mismos. En células humanas del epitelio renal, el subtipo I crece más eficientemente que el IV y, en células Vero, el subtipo III presenta una eficiencia replicativa menor a las del resto de los subtipos [Nukuzuma et al., 2006; Tremolada et al., 2010c].

La conclusión del análisis de distribución de los subtipos del BKPyV en diversas patologías asociadas es que no existe un subtipo específico de la enfermedad neurológica ni de ningún otro tipo de patología.

Como se ha dicho anteriormente, en el paciente PN5, se identificó un cambio del subtipo II, detectado en el primero de los LCRs pertenecientes a dicho paciente, al I identificado en el segundo. Asimismo, una trasplantada de médula ósea en la que se detectó el subtipo III en dos muestras de orina poseía el subtipo I en sangre. Este fenómeno de inestabilidad genómica en la proteína VP1 del BKPyV ya fue descrito por Randhawa en un trasplantado renal. Sucesivas biopsias renales, en el mencionado paciente, mostraron como el subtipo I, primeramente identificado, se convertía en el subtipo IV tras sufrir diversos cambios en las biopsias intermedias [Randhawa et al., 2002]. La existencia frecuente de cuasiespecies de VP1 identificadas en un mismo individuo ha sido documentada por Luo y colaboradores, incluso en individuos sanos con viruria [Luo et al., 2012].

Tras obtener la secuencia completa de VP1 en los grupos de pacientes, así como, en el grupo de las mujeres embarazadas, también se analizaron los cambios aminoacídicos observados en el grupo de pacientes neurológicos con respecto a los controles. En total, se identificaron 17 variantes diferentes, en función de las sustituciones aminoacídicas respecto de la cepa de referencia, para la que se tomó la forma WW excepto por el residuo K73 que se sustituyó por E73 por ser el más común en el resto de cepas del BKPyV.

La variante de referencia fue la forma predominante en los pacientes neurológicos ya que se identificó en el LCR de 12 de los 14 casos neurológicos. En el LCR de los dos pacientes restantes se identificaron las variantes 3 (PN16) y 4 (PN18) y, en el paciente neurológico 5, además de la cepa de referencia, se detectó la variante 1 en una muestra de LCR previa. Las variantes 1 y 4 se identificaron, además, en la sangre y orina de un trasplantado de médula ósea y en la orina de una embarazada, respectivamente. Por su parte, el patrón de mutaciones de la variante 3, así como las mutaciones puntuales E82Q y P18L sí resultaron exclusivas del grupo de pacientes neurológicos, pero cada una de las mismas se encontraba restringida a un único paciente. La mutación P18L ha sido descrita por primera vez en el presente estudio.

Hay que tener en cuenta que la variante de referencia fue la más común en el LCR de los pacientes neurológicos. Además, algunas variantes identificadas en el grupo de los pacientes neurológicos se detectaron en otros grupos de pacientes e incluso en el grupo de las embarazadas. Finalmente, aunque existen cambios aminoácidos específicos de este grupo no están presentes en todos los pacientes. Por todo ello, parece que las sustituciones de aminoácidos en VP1 no son una condición *sine qua non* para el desarrollo de patología neurológica asociada al BKPyV.

La ausencia de correlación entre la presencia de cambios aminoacídicos específicos en la proteína VP1 y el desarrollo de patología neurológica asociada al BKPyV, sugiere que, al igual que en el caso de la región reguladora, la patogenia del virus BK es diferente a la del JCPyV.

Para el JCPyV, se ha demostrado que existen sustituciones aminoacídicas en los bucles externos BC, DE y HI específicas de los pacientes con LMP y que aparecen en el LCR y el plasma de los mismos pero no en la orina. Además, dichas sustituciones no están presentes en los controles sanos [Gorelik et al., 2011; Sunyaev et al., 2009; Zheng et al., 2005a; Zheng et al., 2005b]. Las mencionadas mutaciones determinan cambios en la unión al ácido siálico de los receptores celulares, de forma que se anula el reconocimiento del virus por las células periféricas y se favorece su llegada al SNC [Gorelik et al., 2011; Sunyaev et al., 2009].

Con respecto al BKPyV, para dos pacientes (PN5 y PN8), se disponía de suero pareado al correspondiente LCR positivo. La proteína VP1 se logró amplificar en el suero de uno de los mismos, en el cual se identificó la variante 2, mientras, en el correspondiente LCR, estaba presente la variante de referencia.

Por ello, dado que no se observan mutaciones en la proteína VP1 del BKPyV específicas de los pacientes neurológicos y, teniendo en cuenta que se detectan secuencias diferentes en LCR y suero, parece que, al contrario de lo que ocurre para el JCPyV, no existe una diseminación vía hemática hacia el SNC. Por supuesto, como en el caso de la región reguladora, los datos aportados por el presente estudio no son suficientes para concluir que la cepa del BKPyV que ha dado lugar a la

patología neurológica no haya migrado de la sangre al SNC. No se puede descartar que, una vez en el SNC, la variante presente en sangre haya sido sustituida por una cepa con una secuencia diferente fruto de la adaptación a los genes específicos de ese tejido.

Determinados cambios aminoacídicos en la proteína VP1 del BKPyV observados en los pacientes neurológicos merecen una mención especial. Es el caso de la mutación detectada en el codón del aminoácido R349 que da lugar a un codón de parada en la proteína VP1 detectada en el suero de PN8. Dicha mutación está ausente de la secuencia de VP1 detectada en el LCR de ese mismo paciente y, por lo tanto, se supone que la proteína resultante estaría completa. Como el análisis mediante PCR y secuenciación sólo revela la secuencia de las formas predominantes, se presume que la variante del BKPyV con la proteína VP1 truncada es la mayoritaria en el suero del PN8. Las técnicas de clonaje de todas las cuasiespecies presentes en dicho suero habrían mostrado si coexisten variantes defectivas con la proteína VP1 truncada con otras con la proteína VP1 completa que permitan el empaquetamiento de las primeras y, por tanto, que sean infectivas.

También son reseñables las mutaciones E82D y H139N presentes en los bucle BC y DE de VP1, respectivamente, y detectadas en la proteína VP1 el LCR del PN5. Dichos cambios aminoacídicos también se han identificado en la sangre de dos de los 15 trasplantados renales y en dos de los seis trasplantados de médula ósea incluidos en este estudio. Esta doble mutación fue detectada por Krautkramer en la orina de un trasplantado renal [Krautkramer et al., 2009]. En nuestro estudio, sólo se ha observado en los pacientes con patología asociada a la infección por el BKPyV mientras que la mutación E82D en ausencia de H139N ha sido identificada en la orina de 4 de las 8 embarazadas analizadas. La importancia para la patología del BKPyV de la combinación E82D y H139N debería ser dilucidada.

Finalmente, hay que destacar la doble mutación D75A/S77D la cual fue observada en la cepa del subtipo II detectada en el LCR del PN5, así como, en cepas de los subtipos II y IV identificadas en una trasplantada de médula ósea con cistitis hemorrágica y en un trasplantado renal, respectivamente. Dugan y colaboradores crearon un mutante de la proteína VP1 con dicha sustitución y tras transfectar células Vero con el mismo comprobaron que el mencionado mutante se propagaba *in vitro* como la variante silvestre [Dugan et al., 2007]. En nuestro estudio, se ha visto que las variantes del BKPyV portadoras de ese cambio son capaces de replicar *in vivo* en el contexto de diferentes patologías.

Con respecto al resto de individuos incluidos en este estudio, se llegó a las mismas conclusiones que con los pacientes neurológicos. Pudieron identificarse mutaciones específicas de cada grupo de pacientes, como las mutaciones A265T y Q354T detectadas en la sangre de dos trasplantados renales y que no habían sido descritas en estudios previos, o como la variante 8 que fue detectada,

exclusivamente, en dos trasplantados renales independientes y cuya influencia en la patogenia de la NAPV debería ser estudiada. Sin embargo estos cambios específicos no se observaron en todos los individuos pertenecientes a un mismo grupo. Además, se identificaron cepas idénticas en pacientes con diferentes patologías así como en el grupo control no patológico. Todo ello sugiere que no existe una secuencia específica de la proteína VP1 del BKPyV que esté asociada con la aparición de una determinada enfermedad ni con el desarrollo de patología en general.

Estos resultados confirmaron los obtenidos, en estudios previos, a partir del análisis de la secuencia de los bucles externos de la proteína VP1 del BKPyV, generalmente el bucle BC, en pacientes con nefropatía y lupus eritematoso [Baksh et al., 2001; Bendiksen et al., 2000; Boldorini et al., 2009b; Jin et al., 1995; Krautkramer et al., 2009; Tremolada et al., 2010a; Tremolada et al., 2010b]. La particularidad de nuestro estudio radica en que se ha analizado la proteína completa, en pacientes con diversas patologías asociadas a la infección por el BKPyV, así como, en individuos sanos. Previamente, sólo se tenían referencias de un estudio con la secuencia completa de la proteína VP1 en la orina de trasplantados renales con y sin nefropatía [Tremolada et al., 2010b].

El análisis de la proteína VP1 completa, en todos los pacientes y controles, permitió comprobar que las mutaciones observadas en nuestro estudio se restringían a 35 de los 362 aminoácidos totales, 18 de los cuales están localizados en los bucles externos de VP1. La distribución de las mutaciones en los mencionados aminoácidos no parece tener lugar al azar, sino que existen zonas con más frecuencia de sustituciones aminoacídicas que otras. Estos datos corroboran los obtenidos por Randhawa y colaboradores al analizar el bucle BC en biopsias renales procedentes de pacientes con NAPV [Randhawa et al., 2002].

En concreto, el bucle BC contiene el 33,4% de las sustituciones a pesar de constituir el 9,1% del total de VP1. Por el contrario, el 17,1% de la proteína VP1 que se encuentra localizado en el bucle EF sólo presenta el 8,6% del total de mutaciones. Al comparar las frecuencias de mutaciones de todos los bucles externos de VP1, se observó que BC muestra una tendencia significativamente mayor a poseer mutaciones mientras que EF una tendencia significativamente menor. No se detectó ningún cambio aminoacídico en los bucles CD, GH y HI, sugiriendo la importancia de dichas regiones. Tremolada y colaboradores obtuvieron el mismo resultado al analizar los bucles externos de VP1 provenientes de la orina de trasplantados renales con y sin NAPV [Tremolada et al., 2010b].

En el presente trabajo, se ha visto que ni las reorganizaciones de la región reguladora ni los cambios aminoacídicos en la proteína VP1 parecen ser condiciones ni necesarias ni suficientes para determinar el neurotropismo del BKPyV. La secuenciación del genoma completo de las cepas del BKPyV detectadas en pacientes neurológicos podría arrojar luz sobre si existe algún otro

determinante de neurotropismo que no se haya evaluado en este estudio. Sin embargo, sí se ha visto que los cambios genómicos tanto en la región reguladora como en VP1 podrían tener influencia en la patogenicidad del virus.

En estudios previos, se ha demostrado que las reorganizaciones en la región reguladora del BKPyV alteran la transcripción de los promotores temprano y tardío [Gosert et al., 2008; Markowitz et al., 1990; Moens et al., 1995]. En el caso de las variantes reorganizadas asociadas a la NAPV, se observó un incremento en la expresión de los genes tempranos [Gosert et al., 2008]. Sin embargo, hasta el presente estudio, no se conocía la actividad de los promotores reorganizados pertenecientes a cepas del BKPyV detectadas en pacientes neurológicos.

Para ello, tanto los promotores tempranos como los tardíos pertenecientes a la variable arquetípica WWM y a las variantes reorganizadas identificadas en pacientes neurológicos (RRA a RRF) se introdujeron en sendos plásmidos con actividad luciferasa. Se transfectaron células Vero con dichos plásmidos y la actividad luciferasa de los mismos se midió a las 24 horas postransfección. Dicha actividad luciferasa es proporcional a la actividad de los correspondientes promotores y, por lo tanto, se pudo comparar la actividad de los promotores reorganizados con los correspondientes promotores arquetípicos. Además de los mencionados promotores, se analizaron los promotores correspondientes a la variante Dunlop, la cual, habitualmente, se incluye en los estudios del poliomavirus BK y que, en nuestro estudio, sirvió como control positivo.

Todas las variantes reorganizadas mostraron diferencias significativas en la actividad del promotor temprano con respecto al promotor arquetípico temprano siendo en todos los casos mayor, excepto en la forma RRA. Dicha variante presentó una actividad del promotor temprano que constituía el 60% de la actividad del correspondiente promotor arquetípico. RRA se caracteriza por presentar la delección en el bloque R correspondiente a los nucleótidos 22 al 30. Mediante dicha delección, se eliminan los posibles sitios de unión a diversos factores de transcripción aunque no se sabe si, realmente, esas uniones tienen lugar *in vivo*.

Las variantes RRB y RRF al igual que RRA mantienen la arquitectura lineal OPQRS y presentan delecciones en el bloque R pero, además, poseen delecciones adicionales en otros bloques que pueden determinar las diferencias en la actividad del promotor temprano con RRA. La actividad del promotor temprano en dichas variantes es mayor que la actividad del correspondiente promotor de la variante arquetípica, 5,5 veces para RRB y 2,5 veces para RRF. RRB presenta delecciones en los bloques O, P y R mientras que RRF posee delecciones en los bloques R y S.

Las delecciones observadas en RRB no sólo eliminan sitios de unión a factores de transcripción sino que crean otros nuevos para E47 y HSF1, aunque se desconoce la importancia biológica de dichos sitios. La delección en el bloque O de RRB es muy inusual. El bloque O suele mantenerse muy

conservado ya que, además de contener el ORI, media la activación del promotor temprano del BKPyV mediante los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y C/EBP $\beta$  vía unión de citoquinas [Gorrill and Khalili, 2005; White et al., 2009]. Curiosamente, a pesar de que delección O<sub>25-35</sub> elimina el sitio de unión a NF- $\kappa$ B el cuál se encuentra situado en O<sub>25-34</sub>, RRB presenta niveles altos de la actividad del promotor temprano [Gorrill and Khalili, 2005].

Las variantes RRC, RRD y RRE al igual que la cepa Dunlop no conservan la conformación OPQRS sino que presentan duplicaciones y deleciones de los diferentes bloques, tales como la duplicación del bloque P que es común a todas ellas. De las mencionadas formas, Dunlop es la que presenta mayor actividad del promotor temprano con valores siete veces mayores que los de la variante arquetípica. Dunlop posee la estructura OPPPS lo que sugiere que la duplicación del bloque P y la delección de los bloques Q y R incrementan la actividad del promotor temprano. A diferencia de Dunlop, las mencionadas variantes neurológicas reorganizadas retienen (RRD) o duplican de forma parcial o completa los bloques Q y R (RRC y RRE), lo que podría explicar que presenten menor actividad del promotor temprano que Dunlop. De hecho, el bloque R suele aparecer delecionado total o parcialmente en las variantes detectadas en muestras clínicas [Cubitt, 2006]. Además, la duplicación del bloque P de Dunlop crea dos nuevos sitios de unión a AP1 en la unión entre bloques P que no están presentes en el promotor arquetípico ni en las citadas variantes reorganizadas. Los sitios de unión a AP1 activan el promotor temprano del BKPyV [Moens et al., 1995].

Para las variantes RRC, RRD y RRE, se observó una actividad de los genes tempranos entre 4,2 (RRC) y 1,8 (RRD) veces mayor que la variante arquetípica. En la variante RRC se crea un nuevo sitio de unión al factor de transcripción Sp1 en la unión entre la duplicación parcial del bloque P y el bloque Q, mientras que, en la variante RRD, se crea un nuevo sitio de unión a NF-1 en la duplicación parcial del bloque P. En la variante arquetípica, se ha visto que estos sitios de unión a factores de transcripción son esenciales para la eficiente transcripción de los genes tempranos [Deyerle and Subramani, 1988]. Por ello, la creación de sitios de unión adicionales podría explicar la elevada actividad del promotor temprano observada en dichas variantes.

Salvo la variante RRF, el resto de cepas reorganizadas mostraron diferencias significativas en la actividad del promotor tardío con respecto al promotor arquetípico, lo que demuestra que la delección en el bloque R de RRF no afecta a la actividad del promotor tardío. De hecho, se sabe que en el bloque S existe un elemento de respuesta a hormonas esteroideas que es funcional y que activa la transcripción del promotor tardío [Moens et al., 1994; White et al., 2009] pero la delección S<sub>1-6</sub> detectada en RRF no afecta a dicho elemento presente en S<sub>7-13</sub>. Las variantes RRA y Dunlop mostraron un 70% de la actividad de la variante arquetípica. En la delección R<sub>22-30</sub> de la variante



RRA se eliminan múltiples sitios de unión a factores de transcripción que podrían influir en la actividad del promotor tardío.

El resto de variantes de RRB a RRE presentaron unos valores de actividad del promotor tardío incrementados con respecto a la cepa arquetípica entre 1,3 (RRE) a 2,4 (RRC) veces. Se sabe que las reorganizaciones detectadas en las mencionadas variantes crean y eliminan posibles sitios de unión factores de transcripción, pero se desconoce el alcance biológico en la transcripción de los genes tardíos de dichos sitios.

Gosert y colaboradores analizaron variantes reorganizadas identificadas en biopsias provenientes de pacientes con PVAN. Algunas de dichas variantes presentaban ciertas similitudes con las analizadas en nuestro estudio. La variante de Gosert del (R8-18) es muy similar a nuestra RRA con la delección R<sub>22-30</sub>, pero mientras que la primera mostró el doble de actividad en el promotor temprano que la forma arquetípica y sólo un 20% de actividad del promotor tardío arquetípico, la variante RRA presentó la actividad de ambos promotores disminuía con respecto al promotor arquetípico. Las diferencias entre ambas cepas pueden deberse a que la delección R<sub>8-18</sub> elimine sitios de unión a factores de transcripción que no se delecionan en R<sub>22-30</sub> o los cree en la unión R<sub>7-19</sub> [Gosert et al., 2008].

Nuestra variante RRF es similar a la forma del (13.8) detectada por Gosert y colaboradores ya que la primera presenta delecciones en R<sub>15-63</sub> y en S<sub>1-6</sub> y la segunda muestra delecciones en R<sub>4-63</sub> y S<sub>1-23</sub>. Ambas formas coinciden en presentar la actividad del promotor incrementada con respecto a la variante arquetípica pero mientras que RRF muestra igual actividad del promotor tardío que la cepa arquetípica, la variante del (13.8) la presenta menor, lo cual puede deberse a la eliminación del elemento de respuesta a estrógenos en la segunda variante [Gosert et al., 2008].

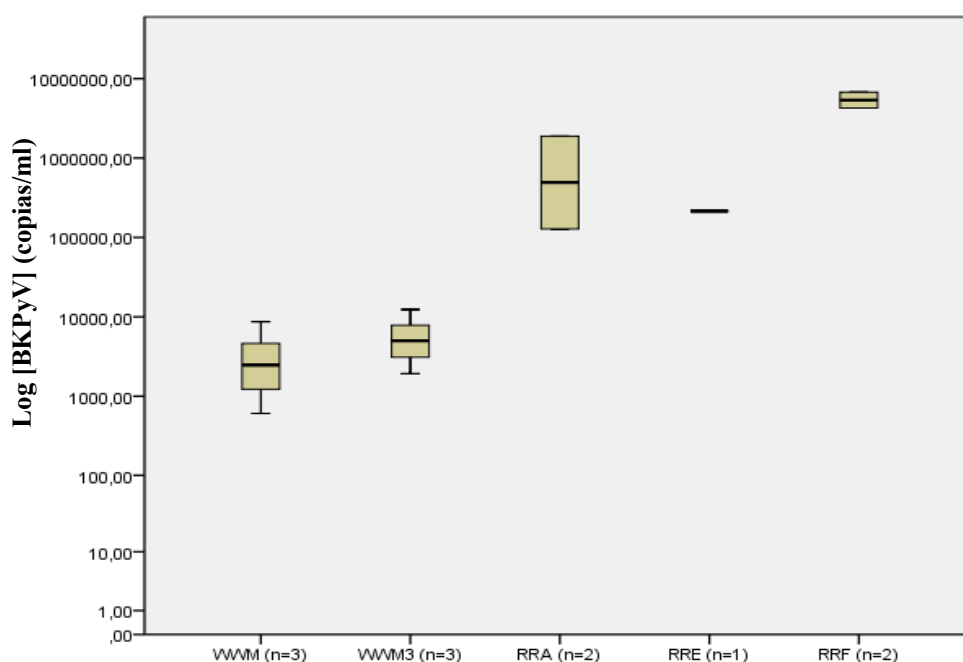
Finalmente, RRD se parece a las formas ins (4.5), ins (7.3) e ins (1483.5) descritas por Gosert y colaboradores. RRD contiene una duplicación de los nucleótidos 18-50 del bloque P y las variantes de Gosert muestran duplicación parcial de P de los nucleótidos 16-68, 21-53 y 8-58, respectivamente. Todas estas formas muestran mayor actividad del promotor temprano que la forma arquetípica. Con respecto a la actividad del promotor tardío, RRD mostró un incremento de la misma con respecto al correspondiente promotor de la forma arquetípica y las variantes analizadas por Gosert y colaboradores, una disminución [Gosert et al., 2008].

Las diferencias en la actividad de los promotores reorganizados tempranos y tardíos con respecto al promotor arquetípico que hemos observado en las variantes identificadas en pacientes neurológicos, también se han observado para las cepas reorganizadas del BKPyV detectadas en pacientes con NAPV y para las variantes reorganizadas del JCPyV identificadas en pacientes con LMP [Gosert et al., 2010; Gosert et al., 2008].

Sin embargo, en el caso de las cepas del BKPyV ligadas a la nefropatía y de las del JCPyV asociadas a la LMP, todos los promotores tempranos analizados mostraron una actividad incrementada mientras que la actividad de los promotores tardíos se veía disminuída con respecto a la forma arquetípica. Nuestras variantes reorganizadas evidenciaron, en general, mayor actividad de ambos promotores excepto RRF cuyo promotor tardío presentó una actividad semejante al promotor arquetípico y RRA con menor actividad de ambos promotores.

Tal y como demostraron Gosert y colaboradores con respecto a la NAPV, las variantes reorganizadas emergen *in vivo* reemplazando a las formas arquetípicas en aquellos casos en los que presentan una ventaja selectiva determinada por una mayor capacidad de transcribir sus genes y de replicar su genoma [Gosert et al., 2008]. En dicho estudio, se observó un incremento de la carga del BKPyV en plasma asociado a la emergencia de formas reorganizadas del virus en dicho fluido, con concentraciones en plasma 20 veces mayores que en el caso de las formas arquetípicas [Gosert et al., 2008].

Por ello, se analizaron las cargas virales de algunas de las variantes reorganizadas respecto de la forma arquetípica WWM en el LCR de los pacientes neurológicos (Tabla 7.1., Figura 7.1.).



**Figura 7.1.**—Carga del BKPyV en el LCR de los pacientes neurológicos.

Se muestran los valores de ADN del BKPyV cuantificados para cada variante en las muestras de LCR en las que ha sido identificada; n=número de muestras.

Desafortunadamente, no se cuenta con datos de la carga del BKPyV en los LCR correspondientes a las variantes reorganizadas RRB, RRC y RRD ya que no quedaba suficiente material. Las variantes RRA, RRE y RRF están asociadas a valores de replicación de 10 (RRA), 15 (RRE) y 300 veces

(RRF) mayores que la forma arquetípica WWM. A pesar de las diferencias observadas, hay que tomar los resultados obtenidos con cautela, ya que no se tienen réplicas suficientes de cada variante para poder llevar a cabo el correspondiente estudio estadístico. La mayor carga viral de las variantes reorganizadas respecto de la forma arquetípica explicaría porque persisten en LCR, incluso en el caso de la forma RRA que reveló poseer menor actividad de los promotores temprano y tardío que la variante WWM. También se disponía de los valores de la carga viral de la cepa arquetípica WWM3 la cual sólo difiere de WWM en algunas mutaciones puntuales. A diferencia de las variantes reorganizadas, no se identificaron diferencias entre la carga viral de esta variante y la carga viral de la forma WW.

Finalmente, en un estudio previo se habían encontrado indicios para pensar que los cambios aminoacídicos en la proteína VP1 del BKPyV detectados en biopsias renales de pacientes con nefropatía podían influir en la estructura de la proteína y, en consecuencia, en la patogenia del virus. En concreto, en la proteína VP1 del BKPyV detectada en dos pacientes con NAPV, se observó la sustitución de un aminoácido hidrofílico por uno hidrofóbico que podría afectar a la estructura secundaria y terciaria de la misma pudiendo alterar la patogenia del virus [Baksh et al., 2001].

En nuestro estudio, se llevó a cabo modelado por ordenador con cada una de las variantes detectadas en pacientes y controles de nuestro estudio en base a la estructura de la proteína VP1 de SV40 obtenida a una resolución de 3,1 Å [Stehle et al., 1996]. El objeto del mismo fue el de predecir el efecto en la estructura de la VP1 del BKPyV del conjunto de los cambios aminoacídicos observados en cada una de las formas analizadas. Las variantes 1 y 4 identificadas en los pacientes neurológicos PN5 y PN18, respectivamente, así como, en otros pacientes y controles y otras formas detectadas en trasplantados renales, trasplantados de médula ósea y en embarazadas demostraron presentar modificaciones considerables en la estructura de VP1 con respecto a la variable de referencia. Estos cambios podrían traducirse en alteraciones en la interacción entre VP1 y el receptor celular o incluso en modificaciones en las propiedades biológicas del virus. Se requerirían estudios funcionales para valorar de forma empírica el efecto de dichos cambios estructurales.

En definitiva, en el presente trabajo de tesis doctoral, se ha desarrollado una metodología diagnóstica que ha permitido la detección y cuantificación simultánea de los poliomavirus humanos BK y JC, así como, la identificación de relaciones inusuales entre patología y agente causal, como es el caso de la infección neurológica debida al BKPyV. La caracterización de las variantes neurológicas de dicho virus, no ha permitido encontrar determinantes de neurovirulencia como los detectados en el JCPyV, aunque sí se han podido identificar factores que podrían tener influencia en la patogenia del BKPyV.

## 8.-CONCLUSIONS

1.- The internally-controlled multiplex real-time PCR developed in the present thesis is suitable for the diagnosis of polyomavirus BK and JC infection, providing a sensitive, reproducible and specific quantification of the viral load of both viruses in samples of patients with associated pathologies.

2.-The median viral load of polyomavirus BK in the cerebrospinal fluid of neurological patients was  $9 \times 10^3$  copies/ml with a range from  $6 \times 10^2$  copies/ml to  $2 \times 10^6$  copies/ml and no differences were seen with polyomavirus JC viral load in the cerebrospinal fluid of progressive multifocal leukoencephalopathy patients.

3.- The archetypal conformation of BK polyomavirus regulatory region was predominant in the neurological patients, renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients and pregnant women, therefore, rearrangements are not sufficient *per se* to create neurotropic strains or to induce neurotropism.

4.-Five out of six early and four out of six late rearranged promoters from BK polyomavirus neurological strains showed significantly higher activity than the corresponding archetypal promoter in transfection studies with Vero cells.

5.- BK polyomavirus subtype I is the most prevalent subtype in the neurological patients and in other groups of patients and controls, such as renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients and pregnant women and, consequently, there is no specific subtype associated to BK-related neurological infection.

6.- BK polyomavirus isolates from either neurological patients, renal transplant recipients or bone marrow transplant recipients do not carry specific VP1 amino acid substitutions, hence, VP1 amino acid substitutions seem to be neither a necessary nor a sufficient condition for the development of the BK polyomavirus-associated neurological infection or other pathologies.

7.- A significant accumulation of amino acid substitutions in the BC loop of BK polyomavirus VP1, while a decreased tendency for EF loop mutations was found through the analysis of the VP1 whole protein in neurological patients, renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients and pregnant women.

8.- Molecular modelling indicated that some VP1 variants of BK polyomavirus identified in neurological patients, renal transplant recipients, bone marrow transplant recipients and pregnant women may have altered host cell receptor binding properties.

## 9.-REFERENCIAS

- Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. 2009a. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol* 19(4):252-260.
- Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ. 2009b. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol* 90(Pt 5):1238-1245.
- Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. 2007. Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J Virol* 81(1):272-279.
- Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. 2010. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology* 397(1):73-79.
- Ahsan N, Shah KV. 2006. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol* 577:1-18.
- Akiyama H, Kurosu T, Sakashita C, Inoue T, Mori S, Ohashi K, Tanikawa S, Sakamaki H, Onozawa Y, Chen Q, Zheng H, Kitamura T. 2001. Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 32(9):1325-1330.
- Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. 2007. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81(8):4130-4136.
- Amir A, Shapiro R, Shulman LM, Mor E, Steinberg R, Fleishhacker H, Bergerin R, Avitzur Y. 2011. BK virus infection and its effect on renal function in pediatric liver-transplant recipients: a cross-sectional, longitudinal, prospective study. *Transplantation* 92(8):943-946.
- Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH. 1988. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis* 158(1):176-181.
- Anzivino E, Bellizzi A, Mitterhofer AP, Tinti F, Barile M, Colosimo MT, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Ferretti G, Taliani G, Pietropaolo V. 2011. Early monitoring of the human polyomavirus BK replication and sequencing analysis in a cohort of adult kidney transplant patients treated with basiliximab. *Virol J* 8(1):407.
- Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. 1989. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27(6):1174-1179.
- Arthur RR, Shah KV, Charache P, Saral R. 1988. BK and JC virus infections in recipients of bone marrow transplants. *J Infect Dis* 158(3):563-569.
- Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP, Jr. 1958. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 81(1):93-111.
- Awadalla Y, Randhawa P, Ruppert K, Zeevi A, Duquesnoy RJ. 2004. HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 4(10):1691-1696.
- Azzi A, De Santis R, Ciappi S, Leoncini F, Sterrantino G, Marino N, Mazzotta F, Laszlo D, Fanci R, Bosi A. 1996. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 2(6):411-416.
- Azzi A, Fanci R, Bosi A, Ciappi S, Zakrzewska K, de Santis R, Laszlo D, Guidi S, Saccardi R, Vannucchi AM, et al. 1994. Monitoring of polyomavirus BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 14(2):235-240.
- Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Perno CF, Ciotti M. 2011. The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol* 34(1):1-8.
- Babel N, Volk HD, Reinke P. 2011. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol* 7(7):399-406.

- Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Randhawa P. 2001. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human polyomavirus-associated interstitial nephritis after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 38(2):354-365.
- Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, Lankry D, Gruda R, Mandelboim O. 2011. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell Host Microbe* 9(2):93-102.
- Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, Dong J. 2010. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *American journal of clinical pathology* 133(2):242-250.
- Bedi A, Miller CB, Hanson JL, Goodman S, Ambinder RF, Charache P, Arthur RR, Jones RJ. 1995. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 13(5):1103-1109.
- Beggs AH, Frisque RJ, Scangos GA. 1988. Extinction of JC virus tumor-antigen expression in glial cell-fibroblast hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(20):7632-7636.
- Behre G, Becker M, Christopeit M. 2008. BK virus encephalitis in an allogeneic hematopoietic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant* 42(7):499.
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM. 2003a. BK virus DNA in CSF of immunocompetent and immunocompromised patients. *Arch Dis Child* 88(2):174-175.
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Bonington A. 2003b. BKV-DNA and JCV-DNA in CSF of patients with suspected meningitis or encephalitis. *Infection* 31(6):374-378.
- Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Khoo SH. 2004. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol* 29(4):224-229.
- Bendixen S, Rekvig OP, Van Ghelue M, Moens U. 2000. VP1 DNA sequences of JC and BK viruses detected in urine of systemic lupus erythematosus patients reveal no differences from strains expressed in normal individuals. *J Gen Virol* 81(Pt 11):2625-2633.
- Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. 2012. BK polyomavirus: Emerging pathogen. *Microbes Infect.*
- Bergallo M, Costa C, Margio S, Sidoti F, Segoloni GP, Ponzi AN, Cavallo R. 2007. Detection and typing of BKV, JCV, and SV40 by multiplex nested polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol* 35(3):243-252.
- Berger JR. 2006. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3:iii48-53.
- Berger JR. 2007. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7(6):461-469.
- Berger JR. 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and newer biological agents. *Drug Saf* 33(11):969-983.
- Berger JR, Levy RM, Flomenhoft D, Dobbs M. 1998. Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 44(3):341-349.
- Bernier G, Morin M, Marsolais G. 1981. A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. *Avian Dis* 25(4):1083-1092.
- Bhattacharjee S, Chakraborty T. 2004. High reactivation of BK virus variants in Asian Indians with renal disorders and during pregnancy. *Virus Genes* 28(2):157-168.
- Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. 2009. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol* 45(3):249-254.
- Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Wang D, Nissen MD, Sloots TP. 2007. A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children. *J Clin Virol* 40(1):15-18.

- Binggeli S, Egli A, Schaub S, Binet I, Mayr M, Steiger J, Hirsch HH. 2007. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 7(5):1131-1139.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Applied and environmental microbiology* 66(1):238-245.
- Bogdanovic G, Priftakis P, Giraud G, Kuzniar M, Ferraldeschi R, Kokhaei P, Mellstedt H, Remberger M, Ljungman P, Winiarski J, Dalianis T. 2004. Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 42(11):5394-5396.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Nestasio I, Paganotti A, Veggiani C, Monga G, Pietropaolo V. 2010. BK virus sequences in specimens from aborted fetuses. *J Med Virol* 82(12):2127-2132.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Cocca N, Zaffaroni M, Riboni F, Monga G, Viscidi R. 2011. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *The Journal of general virology* 92(Pt 5):1044-1050.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C. 2009a. Detection, distribution, and pathologic significance of BK virus strains isolated from patients with kidney transplants, with and without polyomavirus-associated nephropathy. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133(5):766-774.
- Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, Monga G, Pietropaolo V. 2009b. Genomic mutations of viral protein 1 and BK virus nephropathy in kidney transplant recipients. *J Med Virol* 81(8):1385-1393.
- Boldorini R, Brustia M, Veggiani C, Barco D, Andorno S, Monga G. 2005a. Periodic assessment of urine and serum by cytology and molecular biology as a diagnostic tool for BK virus nephropathy in renal transplant patients. *Acta cytologica* 49(3):235-243.
- Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. 2005b. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *American journal of clinical pathology* 124(2):303-312.
- Bolen JB, Consigli RA. 1979. Differential adsorption of polyoma virions and capsids to mouse kidney cells and guinea pig erythrocytes. *J Virol* 32(2):679-683.
- Boothpur R, Brennan DC. 2010. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J Clin Virol* 47(4):306-312.
- Bozeman LH, Davis RB, Gaudry D, Lukert PD, Fletcher OJ, Dykstra MJ. 1981. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis* 25(4):972-980.
- Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *Aids* 13(9):1071-1075.
- Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA. 2005. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 5(3):582-594.
- Broekema NM, Abend JR, Bennett SM, Butel JS, Vanchiere JA, Imperiale MJ. 2010. A system for the analysis of BKV non-coding control regions: application to clinical isolates from an HIV/AIDS patient. *Virology* 407(2):368-373.
- Brooks BR, Walker DL. 1984. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol Clin* 2(2):299-313.
- Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, Kreps MA, Kremers WK, Gloor JM, Schwab TR, Velosa JA, Fidler ME, Larson TS, Griffin MD. 2003. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 64(2):665-673.

- Cabrejo L, Diop M, Blohorn-Sense A, Mihout B. 2005. [Progressive BK virus associated multifocal leukoencephalopathy in an immunocompromised patient treated with corticosteroids]. *Rev Neurol (Paris)* 161(3):326-330.
- Campbell KS, Mullane KP, Aksoy IA, Stubdal H, Zalvide J, Pipas JM, Silver PA, Roberts TM, Schaffhausen BS, DeCaprio JA. 1997. DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev* 11(9):1098-1110.
- Carr MJ, McCormack GP, Mutton KJ, Crowley B. 2006. Unique BK virus non-coding control region (NCCR) variants in hematopoietic stem cell transplant recipients with and without hemorrhagic cystitis. *J Med Virol* 78(4):485-493.
- Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, Laubach J, Bawn SD, Gordon LI, Winter JN, Furman RR, Vose JM, Zelenetz AD, Mamtani R, Raisch DW, Dorshimer GW, Rosen ST, Muro K, Gottardi-Littell NR, Talley RL, Sartor O, Green D, Major EO, Bennett CL. 2009a. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 113(20):4834-4840.
- Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP, Bennett CL. 2009b. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol* 10(8):816-824.
- Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, Johnson LG, Lemos BD, Lee S, Warcola AH, Iyer JG, Nghiem P, Galloway DA. 2009. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 101(21):1510-1522.
- Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM. 1997. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 66(1):39-50.
- Cimbaluk D, Pitelka L, Kluskens L, Gattuso P. 2009. Update on human polyomavirus BK nephropathy. *Diagnostic cytopathology* 37(10):773-779.
- Cinque P, Koralknik IJ, Gerevini S, Miro JM, Price RW. 2009. Progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis* 9(10):625-636.
- Cinque P, Scarpellini P, Vago L, Linde A, Lazzarin A. 1997. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *Aids* 11(1):1-17.
- Clayson ET, Brando LV, Compans RW. 1989. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *J Virol* 63(5):2278-2288.
- Clifford DB, De Luca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A. 2010. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 9(4):438-446.
- Clifford DB, Yiannoutsos C, Glicksman M, Simpson DM, Singer EJ, Piliero PJ, Marra CM, Francis GS, McArthur JC, Tyler KL, Tselis AC, Hyslop NE. 1999. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52(3):623-625.
- Colegrove KM, Wellehan JF, Jr., Rivera R, Moore PF, Gulland FM, Lowenstine LJ, Nordhausen RW, Nollens HH. 2010. Polyomavirus infection in a free-ranging California sea lion (*Zalophus californianus*) with intestinal T-cell lymphoma. *J Vet Diagn Invest* 22(4):628-632.
- Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. 1980. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis* 142(1):1-8.
- Collins KL, Kelly TJ. 1991. Effects of T antigen and replication protein A on the initiation of DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase. *Mol Cell Biol* 11(4):2108-2115.
- Costa J. 2004. [Real-time PCR]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(5):299-304; quiz 305.
- Crum-Cianflone N, Quigley M, Utz G, Hale B. 2007. BK virus-associated renal failure among HIV patients. *Aids* 21(11):1501-1502.



- Cubitt CL. 2006. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol* 577:85-95.
- Chang D, Tsai RT, Wang M, Ou WC. 1996a. Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J Med Virol* 48(2):204-209.
- Chang D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT. 1996b. Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol* 48(1):95-101.
- Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. 2000. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol* 60(3):353-362.
- Chen CH, Wen MC, Wang M, Lian JD, Wu MJ, Cheng CH, Shu KH, Chang D. 2001. A regulatory region rearranged BK virus is associated with tubulointerstitial nephritis in a rejected renal allograft. *J Med Virol* 64(1):82-88.
- Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Soderlund-Venermo M, Hedman K. 2011. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *J Infect Dis* 204(10):1523-1526.
- Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, Kocher O, Joseph JT, Koralnik IJ. 2004. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen Virol* 85(Pt 9):2651-2663.
- Chen Y, Trofe J, Gordon J, Du Pasquier RA, Roy-Chaudhury P, Kuroda MJ, Woodle ES, Khalili K, Koralnik IJ. 2006. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol* 80(7):3495-3505.
- Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. 1983. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147(4):676-684.
- Dall A, Hariharan S. 2008. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 2:S68-75.
- Daniel AM, Swenson JJ, Mayreddy RP, Khalili K, Frisque RJ. 1996. Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. *Virology* 216(1):90-101.
- Daniel DC, Wortman MJ, Schiller RJ, Liu H, Gan L, Mellen JS, Chang CF, Gallia GL, Rappaport J, Khalili K, Johnson EM. 2001. Coordinate effects of human immunodeficiency virus type 1 protein Tat and cellular protein Puralpha on DNA replication initiated at the JC virus origin. *J Gen Virol* 82(Pt 7):1543-1553.
- Daniels R, Sadowicz D, Hebert DN. 2007. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog* 3(7):e98.
- De Luca A, Ammassari A, Pezzotti P, Cinque P, Gasnault J, Berenguer J, Di Giambenedetto S, Cingolani A, Taoufik Y, Miralles P, Marra CM, Antinori A. 2008. Cidofovir in addition to antiretroviral treatment is not effective for AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a multicohort analysis. *Aids* 22(14):1759-1767.
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, Grisetti S, Paglia MG, Gentile M, Cingolani A, Murri R, Liuzzi G, Monforte AD, Antinori A. 2000. The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 182(4):1077-1083.
- De Mattei M, Martini F, Corallini A, Gerosa M, Scotlandi K, Carinci P, Barbanti-Brodano G, Tognon M. 1995. High incidence of BK virus large-T-antigen-coding sequences in normal human tissues and tumors of different histotypes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 61(6):756-760.
- de Oña Navarro MaFA, J. 2006. Infecciones por virus JC, virus BK y otros poliomavirus. In: Ausina Ruiz VaMG, S., editor. *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana. p 795-800.
- Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Jin L, Ameglio F, Cordiali-Fei P, Trento E, Sinibaldi L, Orsi N. 1999. Identification of a new control region in the genome of the DDP strain of BK virus isolated from PBMC. *J Med Virol* 58(4):413-419.
- Degener AM, Pietropaolo V, Di Taranto C, Rizzuti V, Ameglio F, Cordiali Fei P, Caprilli F, Capitanio B, Sinibaldi L, Orsi N. 1997. Detection of JC and BK viral genome in specimens of HIV-1 infected subjects. *New Microbiol* 20(2):115-122.

- del Pilar Martin M, Cravens PD, Winger R, Frohman EM, Racke MK, Eagar TN, Zamvil SS, Weber MS, Hemmer B, Karandikar NJ, Kleinschmidt-DeMasters BK, Stuve O. 2008. Decrease in the numbers of dendritic cells and CD4+ T cells in cerebral perivascular spaces due to natalizumab. *Arch Neurol* 65(12):1596-1603.
- Delbue S, Branchetti E, Bertolacci S, Tavazzi E, Marchioni E, Maserati R, Minnucci G, Tremolada S, Vago G, Ferrante P. 2009. JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 15(1):51-56.
- Delbue S, Pagani E, Guerini FR, Agliardi C, Mancuso R, Borghi E, Rossi F, Boldorini R, Veggiani C, Car PG, Ferrante P. 2005a. Distribution, characterization and significance of polyomavirus genomic sequences in tumors of the brain and its covering. *J Med Virol* 77(3):447-454.
- Delbue S, Sotgiu G, Fumagalli D, Valli M, Borghi E, Mancuso R, Marchioni E, Maserati R, Ferrante P. 2005b. A case of a progressive multifocal leukoencephalopathy patient with four different JC virus transcriptional control region rearrangements in cerebrospinal fluid, blood, serum, and urine. *J Neurovirol* 11(1):51-57.
- Delbue S, Tremolada S, Elia F, Carloni C, Amico S, Tavazzi E, Marchioni E, Novati S, Maserati R, Ferrante P. 2010. Lymphotropic polyomavirus is detected in peripheral blood from immunocompromised and healthy subjects. *J Clin Virol* 47(2):156-160.
- Deyerle KL, Subramani S. 1988. Linker scan analysis of the early regulatory region of human papovavirus BK. *J Virol* 62(9):3378-3387.
- Dharnidharka VR, Abdulnour HA, Araya CE. 2011. The BK virus in renal transplant recipients- review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatr Nephrol* 26(10):1763-1774.
- Di Taranto C, Pietropaolo V, Orsi GB, Jin L, Sinibaldi L, Degener AM. 1997. Detection of BK polyomavirus genotypes in healthy and HIV-positive children. *Eur J Epidemiol* 13(6):653-657.
- Ding R, Medeiros M, Dadhania D, Muthukumar T, Kracker D, Kong JM, Epstein SR, Sharma VK, Seshan SV, Li B, Suthanthiran M. 2002. Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 74(7):987-994.
- Doerries K. 2006. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol* 577:102-116.
- Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. 2000. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *The Journal of general virology* 81(Pt 8):1967-1973.
- Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E. 1992. Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *Embo J* 11(2):769-776.
- Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. 1994. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198(1):59-70.
- Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E. 2007. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 84(3):323-330.
- Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E. 2006. Histologic versus molecular diagnosis of BK polyomavirus-associated nephropathy: a shifting paradigm? *Clin J Am Soc Nephrol* 1(3):374-379.
- Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, Weir MR, Cangro CB, Klassen DK, Khaled A, Cunningham R, Bartlett ST. 2001. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant* 1(4):373-381.
- Droller MJ, Saral R, Santos G. 1982. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology* 20(3):256-258.

- Dropulic LK, Jones RJ. 2008. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 41(1):11-18.
- Du Pasquier RA, Corey S, Margolin DH, Williams K, Pfister LA, De Girolami U, Mac Key JJ, Wuthrich C, Joseph JT, Koralnik IJ. 2003. Productive infection of cerebellar granule cell neurons by JC virus in an HIV+ individual. *Neurology* 61(6):775-782.
- Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. 2005. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol* 79(22):14442-14445.
- Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. 2006. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis* 8(2):62-67.
- Dugan AS, Gasparovic ML, Tsomaia N, Mierke DF, O'Hara BA, Manley K, Atwood WJ. 2007. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. *J Virol* 81(21):11798-11808.
- Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, Gasparovic ML, Manley K, Page R, Williams G, Porter E, O'Hara BA, Atwood WJ. 2008. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. *J Biol Chem* 283(45):31125-31132.
- Dumonceaux TJ, Mesa C, Severini A. 2008. Internally controlled triplex quantitative PCR assay for human polyomaviruses JC and BK. *J Clin Microbiol* 46(9):2829-2836.
- Duncavage EJ, Zehnbauser BA, Pfeifer JD. 2009. Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 22(4):516-521.
- Eash S, Atwood WJ. 2005. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol* 79(18):11734-11741.
- Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. 2006. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci* 63(7-8):865-876.
- Eash S, Querbes W, Atwood WJ. 2004. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* 78(21):11583-11590.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. 2009. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *J Infect Dis*.
- Elsner C, Dorries K. 1992. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology* 191(1):72-80.
- Engsig FN, Hansen AB, Omland LH, Kronborg G, Gerstoft J, Laursen AL, Pedersen C, Mogensen CB, Nielsen L, Obel N. 2009. Incidence, clinical presentation, and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era: a nationwide cohort study. *J Infect Dis* 199(1):77-83.
- Erard V, Kim HW, Corey L, Limaye A, Huang ML, Myerson D, Davis C, Boeckh M. 2005. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 106(3):1130-1132.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19(1):165-256.
- Faguer S, Hirsch HH, Kamar N, Guilbeau-Frugier C, Ribes D, Guitard J, Esposito L, Cointault O, Modesto A, Lavit M, Mengelle C, Rostaing L. 2007. Leflunomide treatment for polyomavirus BK-associated nephropathy after kidney transplantation. *Transpl Int* 20(11):962-969.
- Fedele CG, Avellon A, Ciardi M, Delia S, Tenorio A. 2000. Quantitation of polyomavirus DNA by a competitive nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 88(1):51-61.
- Fedele CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A. 1999. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods* 82(2):137-144.
- Feigenbaum L, Khalili K, Major E, Khoury G. 1987. Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(11):3695-3698.
- Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. 2006. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene* 25(38):5277-5285.

- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319(5866):1096-1100.
- Ferrari A, Luppi M, Marasca R, Potenza L, Morselli M, Volzone F, Santachiara R, Forghieri F, Barozzi P, Torelli G. 2008. BK virus infection and neurologic dysfunctions in a patient with lymphoma treated with chemotherapy and rituximab. *European journal of haematology* 81(3):244-245.
- Flaegstad T, Sundsfjord A, Arthur RR, Pedersen M, Traavik T, Subramani S. 1991. Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology* 180(2):553-560.
- Friedman DP, Flanders AE. 2006. MR Imaging of BK virus encephalitis. *AJNR American journal of neuroradiology* 27(5):1016-1018.
- Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima S, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. 2010. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous quantification of BK polyomavirus, JC polyomavirus, and adenovirus DNA. *J Clin Microbiol* 48(3):825-830.
- Galan A, Rauch CA, Otis CN. 2005. Fatal BK polyoma viral pneumonia associated with immunosuppression. *Hum Pathol* 36(9):1031-1034.
- Ganguly N, Clough LA, Dubois LK, McGuirk JP, Abhyankar S, Aljitawi OS, O'Neal N, Divine CL, Ganguly S. 2010. Low-dose cidofovir in the treatment of symptomatic BK virus infection in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis of an algorithmic approach. *Transpl Infect Dis* 12(5):406-411.
- Garavelli PL, Boldorini R. 2002. [BK virus encephalitis in an HIV-seropositive patient. Preliminary data]. *Recenti Prog Med* 93(4):247.
- Garcia Ligerio J, Mora Peris B, Garcia Garcia F, Navas Pastor J, Tomas Ros M, Sempere Gutierrez A, Rico Galiano JL, Fontana Compiano LO. 2002. [Hemorrhagic cystitis caused by BK and JC polyomavirus in patients treated with bone marrow transplantation: clinical features and urologic management]. *Actas Urol Esp* 26(2):104-110.
- Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1(7712):1253-1257.
- Gardner SD, Knowles WA, Hand JF, Porter AA. 1989. Characterization of a new polyomavirus (Polyomavirus papionis-2) isolated from baboon kidney cell cultures. *Arch Virol* 105(3-4):223-233.
- Gasnault J, Kahraman M, de Goer de Herve MG, Durali D, Delfraissy JF, Taoufik Y. 2003. Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *Aids* 17(10):1443-1449.
- Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3(5):e64.
- Geschwind MD, Skolasky RI, Royal WS, McArthur JC. 2001. The relative contributions of HAART and alpha-interferon for therapy of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. *J Neurovirol* 7(4):353-357.
- Gibson PE, Gardner SD, Field AM. 1986. Use of a molecular probe for detecting JCV DNA directly in human brain material. *J Med Virol* 18(1):87-95.
- Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, Fontana I, Nocera A, Cardillo M, Ciardi MR, Locatelli F, Maccario R, Perfumo F, Azzi A. 2003. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 75(8):1266-1270.
- Goetz GS, Dean FB, Hurwitz J, Matson SW. 1988. The unwinding of duplex regions in DNA by the simian virus 40 large tumor antigen-associated DNA helicase activity. *J Biol Chem* 263(1):383-392.
- Gorczyńska E, Turkiewicz D, Rybka K, Toporski J, Kalwak K, Dyla A, Szczyra Z, Chybicka A. 2005. Incidence, clinical outcome, and management of virus-induced hemorrhagic cystitis in children and adolescents after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 11(10):797-804.

- Gorelik L, Reid C, Testa M, Brickelmaier M, Bossolasco S, Pazzi A, Bestetti A, Carmillo P, Wilson E, McAuliffe M, Tonkin C, Carulli JP, Lugovskoy A, Lazzarin A, Sunyaev S, Simon K, Cinque P. 2011. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. *J Infect Dis* 204(1):103-114.
- Gorrill T, Feliciano M, Mukerjee R, Sawaya BE, Khalili K, White MK. 2006. Activation of early gene transcription in polyomavirus BK by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Gen Virol* 87(Pt 6):1557-1566.
- Gorrill TS, Khalili K. 2005. Cooperative interaction of p65 and C/EBPbeta modulates transcription of BKV early promoter. *Virology* 335(1):1-9.
- Gosert R, Kardas P, Major EO, Hirsch HH. 2010. Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *J Virol* 84(20):10448-10456.
- Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. 2008. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med* 205(4):841-852.
- Goudsmit J, Baak ML, Sletterus KW, Van der Noordaa J. 1981. Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 283(6303):1363-1364.
- Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. 1982. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 10(2):91-99.
- Graffi A, Schramm T, Bender E, Bierwolf D, Graffi I. 1967. [On a new virus containing skin tumor in golden hamster]. *Arch Geschwulstforsch* 30(4):277-283.
- Groenewoud MJ, Fagrouch Z, van Gessel S, Niphuis H, Bulavaite A, Warren KS, Heeney JL, Verschoor EJ. 2010. Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran orang-utans. *J Gen Virol* 91(Pt 3):653-658.
- Gross L. 1953a. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83(2):414-421.
- Gross L. 1953b. Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 X g), Ak-leukemic extracts. *Cancer* 6(5):948-958.
- Gross L. 1954. Transmission of Ak leukemic agent into newborn mice of the C57 brown/cd inbred line. *Proc Soc Exp Biol Med* 86(4):734-739.
- Guerin JL, Gelfi J, Dubois L, Vuillaume A, Boucraut-Baralon C, Pingret JL. 2000. A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *J Virol* 74(10):4523-4529.
- Gunson RN, Collins TC, Carman WF. 2006. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol* 35(4):355-367.
- Halami MY, Dorrestein GM, Couteel P, Heckel G, Muller H, Johne R. 2010. Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *J Gen Virol* 91(Pt 12):3016-3022.
- Hall CD, Dafni U, Simpson D, Clifford D, Wetherill PE, Cohen B, McArthur J, Hollander H, Yainnoutsos C, Major E, Millar L, Timpone J. 1998. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. *N Engl J Med* 338(19):1345-1351.
- Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. 1996. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol* 70(4):2378-2386.
- Hashida Y, Gaffney PC, Yunis EJ. 1976. Acute hemorrhagic cystitis of childhood and papovavirus-like particles. *J Pediatr* 89(1):85-87.
- Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* 106(1):129-132.

- Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. 1981. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol* 8(2):143-150.
- Hirsch HH. 2005. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 41(3):354-360.
- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nicleleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. 2005. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 79(10):1277-1286.
- Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E. 2006. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol* 577:160-173.
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. 2002. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 347(7):488-496.
- Hix JK, Braun WE, Isada CM. 2004. Delirium in a renal transplant recipient associated with BK virus in the cerebrospinal fluid. *Transplantation* 78(9):1407-1408.
- Husseiny MI, Anastasi B, Singer J, Lacey SF. 2010. A comparative study of Merkel cell, BK and JC polyomavirus infections in renal transplant recipients and healthy subjects. *J Clin Virol* 49(2):137-140.
- Ikegaya H, Saukko PJ, Terti R, Metsarinne KP, Carr MJ, Crowley B, Sakurada K, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y. 2006. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *J Gen Virol* 87(Pt 11):3201-3208.
- Imperiale MJ, E.O. 2007. Polyomaviridae. Knipe DM, Howley, P.M., Griffin, D.E. et al., editor. Philadelphia, Pa, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ito Y, Hsia S, Evans CA. 1966. Rabbit kidney vacuolating virus: extraction of infectious DNA. *Virology* 29(1):26-31.
- Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. 2009a. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 384(2):266-273.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. 2009b. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* 83(3):1350-1358.
- Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. 2011. Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. *MBio* 2(1):e00281-00210.
- Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. 1993. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol* 41(1):11-17.
- Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Ward KH, Brown DW. 1995. Prevalence and distribution of BK virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by PCR-restriction enzyme analysis. *Clin Diagn Virol* 3(3):285-295.
- Johannessen M, Myhre MR, Dragset M, Tummler C, Moens U. 2008. Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology* 379(1):97-109.
- Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. 2011. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 156(9):1627-1634.
- Johne R, Enderlein D, Nieper H, Muller H. 2005. Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR. *J Virol* 79(6):3883-3887.
- Johne R, Muller H. 2003. The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus. *Virology* 308(2):291-302.
- Johne R, Muller H. 2007. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J Virol* 81(21):11554-11559.
- Johne R, Wittig W, Fernandez-de-Luco D, Hofle U, Muller H. 2006. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol* 80(7):3523-3531.
- Johnson EM. 2010. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol* 18(5):215-223.

- Jorgensen GE, Hammarin AL, Bratt G, Grandien M, Flaegstad T, Johnsen JI. 2003. Identification of a unique BK virus variant in the CNS of a patient with AIDS. *J Med Virol* 70(1):14-19.
- Kassem A, Schopflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, Zur Hausen A. 2008. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res* 68(13):5009-5013.
- Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Tominaga T, Ishikawa A, Zheng HY, Yogo Y. 2004. Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol* 10(4):244-249.
- Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, Angonin R, Fontaniere B, Moret H. 2003. The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation* 76(11):1653-1655.
- Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5(3):e1000363.
- Kenney S, Natarajan V, Strike D, Khoury G, Salzman NP. 1984. JC virus enhancer-promoter active in human brain cells. *Science* 226(4680):1337-1339.
- Kepes JJ, Chou SM, Price LW, Jr. 1975. Progressive multifocal leukoencephalopathy with 10-year survival in a patient with nontropical sprue. Report of a case with unusual light and electron microscopic features. *Neurology* 25(11):1006-1012.
- Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. 2005. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol* 204(1):1-7.
- Kierstead TD, Tevethia MJ. 1993. Association of p53 binding and immortalization of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts by using simian virus 40 T-antigen mutants bearing internal overlapping deletion mutations. *J Virol* 67(4):1817-1829.
- Kilham L, Murphy HW. 1953. A pneumotropic virus isolated from C3H mice carrying the Bittner Milk Agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(1):133-137.
- Kinnaird AN, Anstead GM. 2010. Hemorrhagic cystitis and possible neurologic disease from BK virus infection in a patient with AIDS. *Infection* 38(2):124-127.
- Kjaerheim K, Roe OD, Waterboer T, Sehr P, Rizk R, Dai HY, Sandeck H, Larsson E, Andersen A, Boffetta P, Pawlita M. 2007. Absence of SV40 antibodies or DNA fragments in prediagnostic mesothelioma serum samples. *Int J Cancer* 120(11):2459-2465.
- Knowles WA. 2006. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 577:19-45.
- Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, Hand JF, Brown DW. 1999. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol* 59(4):474-479.
- Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E. 2003. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 71(1):115-123.
- Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, Lord CI, Letvin NL. 1999. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52(2):253-260.
- Krachmarov CP, Chepenik LG, Barr-Vagell S, Khalili K, Johnson EM. 1996. Activation of the JC virus Tat-responsive transcriptional control element by association of the Tat protein of human immunodeficiency virus 1 with cellular protein Pur alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):14112-14117.
- Krautkramer E, Klein TM, Sommerer C, Schnitzler P, Zeier M. 2009. Mutations in the BC-loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. *J Med Virol* 81(1):75-81.
- Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE. 1990. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol* 64(9):4414-4420.
- Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P. 2006. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol* 78(12):1588-1598.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3):95-125.

- Kuypers DR, Vandooren AK, Lerut E, Evenepoel P, Claes K, Snoeck R, Naesens L, Vanrenterghem Y. 2005. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5(8):1997-2004.
- Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR. 1999. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7484-7489.
- Laghi L, Randolph AE, Malesci A, Boland CR. 2004. Constraints imposed by supercoiling on in vitro amplification of polyomavirus DNA. *J Gen Virol* 85(Pt 11):3383-3388.
- Lam WY, Leung BW, Chu IM, Chan AC, Ng HK, Chan PK. 2010. Survey for the presence of BK, JC, KI, WU and Merkel cell polyomaviruses in human brain tissues. *J Clin Virol* 48(1):11-14.
- Ledesma J, Munoz P, Garcia de Viedma D, Cabrero I, Loeches B, Montilla P, Gijon P, Rodriguez-Sanchez B, Bouza E. 2011. BK virus infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Lemos B, Nghiem P. 2007. Merkel cell carcinoma: more deaths but still no pathway to blame. *J Invest Dermatol* 127(9):2100-2103.
- Lesprit P, Chaline-Lehmann D, Authier FJ, Ponnelle T, Gray F, Levy Y. 2001. BK virus encephalitis in a patient with AIDS and lymphoma. *Aids* 15(9):1196-1199.
- Leung AY, Chan MT, Yuen KY, Cheng VC, Chan KH, Wong CL, Liang R, Lie AK, Kwong YL. 2005a. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 40(4):528-537.
- Leung AY, Mak R, Lie AK, Yuen KY, Cheng VC, Liang R, Kwong YL. 2002. Clinicopathological features and risk factors of clinically overt haemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29(6):509-513.
- Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. 2005b. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant* 36(11):929-937.
- Li RM, Mannon RB, Kleiner D, Tsokos M, Bynum M, Kirk AD, Kopp JB. 2002. BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 74(11):1497-1504.
- Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354(6351):278-284.
- Limaye AP, Smith KD, Cook L, Groom DA, Hunt NC, Jerome KR, Boeckh M. 2005. Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5(3):614-620.
- Lopes da Silva R. 2011a. BK virus neurotropism. *J Infect Public Health* 4(2):103-104.
- Lopes da Silva R. 2011b. Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 15(3):276-284.
- Lopes da Silva R, Ferreira I, Teixeira G, Cordeiro D, Mafra M, Costa I, Bravo Marques JM, Abecasis M. 2011. BK virus encephalitis with thrombotic microangiopathy in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 13(2):161-167.
- Lopez V, Gutierrez C, Sola E, Garcia I, Burgos D, Cabello M, Leon M, Molina MG, Hernandez D. 2011. Does JC polyomavirus cause nephropathy in renal transplant patients? *Transplant Proc* 42(8):2889-2891.
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. 2006. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol* 80(3):1361-1366.
- Lu MC, Yu CL, Yin WY, Tung CH, Huang KY, Liu SQ, Lai NS. 2009. Increased prevalence of polyomavirus BK viruria that correlates with thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus on intensive immunosuppressive therapy. *Autoimmunity* 42(3):216-223.
- Lundstig A, Dillner J. 2006. Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 577:96-101.
- Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. 2012. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *J Med Virol* 84(1):152-161.



- Mackay IM. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10(3):190-212.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30(6):1292-1305.
- Major EO, Miller AE, Mourrain P, Traub RG, de Widt E, Sever J. 1985. Establishment of a line of human fetal glial cells that supports JC virus multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(4):1257-1261.
- Malherbe H, Harwin R. 1963. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *S Afr Med J* 37:407-411.
- Manfredi JJ, Dong J, Liu WJ, Resnick-Silverman L, Qiao R, Chahinian P, Saric M, Gibbs AR, Phillips JI, Murray J, Axten CW, Nolan RP, Aaronson SA. 2005. Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res* 65(7):2602-2609.
- Manitpisitkul W, Wilson NS, Haririan A. 2010. Immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: an overview and update. *Expert Opin Drug Saf* 9(6):959-969.
- Marinelli K, Bagnarelli P, Gaffi G, Trappolini S, Leoni P, Paggi AM, Della Vittoria A, Scalise G, Valardo PE, Menzo S. 2007. PCR real time assays for the early detection of BKV-DNA in immunocompromised patients. *New Microbiol* 30(3):275-278.
- Markowitz RB, Dynan WS. 1988. Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *J Virol* 62(9):3388-3398.
- Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS. 1991. BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65(8):4515-4519.
- Markowitz RB, Tolbert S, Dynan WS. 1990. Promoter evolution in BK virus: functional elements are created at sequence junctions. *J Virol* 64(5):2411-2415.
- Marshall LJ, Major EO. 2010. Molecular regulation of JC virus tropism: insights into potential therapeutic targets for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 5(3):404-417.
- Marzocchetti A, Di Giambenedetto S, Cingolani A, Ammassari A, Cauda R, De Luca A. 2005. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 43(8):4175-4177.
- Marzocchetti A, Wuthrich C, Tan CS, Tompkins T, Bernal-Cano F, Bhargava P, Ropper AH, Koralnik IJ. 2008. Rearrangement of the JC virus regulatory region sequence in the bone marrow of a patient with rheumatoid arthritis and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 14(5):455-458.
- Matthews MR, Wang RC, Reddick RL, Saldivar VA, Browning JC. 2011. Viral-associated trichodysplasia spinulosa: a case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. *J Cutan Pathol* 38(5):420-431.
- McCance DJ. 1983. Persistence of animal and human papovaviruses in renal and nervous tissues. *Prog Clin Biol Res* 105:343-357.
- Melendy T, Stillman B. 1993. An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication. *J Biol Chem* 268(5):3389-3395.
- Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, Eden G, Schwarz A, Haller H, Kreipe H. 2003. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 18(6):1190-1196.
- Mischitelli M, Fioriti D, Anzivino E, Bellizzi A, Barucca V, Boldorini R, Miglio U, Sica S, Sora F, De Matteis S, Chiarini F, Pietropaolo V. 2010. Viral infection in bone marrow transplants: is JC virus involved? *J Med Virol* 82(1):138-145.
- Misra V, Dumonceaux T, Dubois J, Willis C, Nadin-Davis S, Severini A, Wandeler A, Lindsay R, Artsob H. 2009. Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J Gen Virol* 90(Pt 8):2015-2022.

- Moens U. 2009. Silencing viral microRNA as a novel antiviral therapy? *J Biomed Biotechnol* 2009:419539.
- Moens U, Johannessen M. 2008. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. *J Dtsch Dermatol Ges* 6(9):704-708.
- Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. 1995. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* 10(3):261-275.
- Moens U, Ludvigsen M, Van Ghelue M. 2011. Human polyomaviruses in skin diseases. *Patholog Res Int* 2011:123491.
- Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T. 1994. A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol* 68(4):2398-2408.
- Moens U, Van Ghelue M. 2005. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology* 331(2):209-231.
- Moens U, Van Ghelue M, Johannessen M. 2007. Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins. *Cell Mol Life Sci* 64(13):1656-1678.
- Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. 1998. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol* 72(12):9918-9923.
- Monini P, de Lellis L, Rotola A, Di Luca D, Ravaioli T, Bigoni B, Cassai E. 1995a. Chimeric BK virus DNA episomes in a papillary urothelial bladder carcinoma. *Intervirology* 38(5):304-308.
- Monini P, Rotola A, Di Luca D, De Lellis L, Chiari E, Corallini A, Cassai E. 1995b. DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology* 214(1):273-279.
- Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. 2007. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 81(16):8552-8562.
- Muller H, Nitschke R. 1986. A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med Microbiol Immunol* 175(1):1-13.
- Munoz P, Fogeda M, Bouza E, Verde E, Palomo J, Banares R. 2005. Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis* 41(12):1720-1725.
- Negrini M, Sabbioni S, Arthur RR, Castagnoli A, Barbanti-Brodano G. 1991. Prevalence of the archetypal regulatory region and sequence polymorphisms in nonpassaged BK virus variants. *J Virol* 65(9):5092-5095.
- Neske F, Prifert C, Scheiner B, Ewald M, Schubert J, Opitz A, Weissbrich B. 2010. High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors. *BMC Infect Dis* 10:215.
- Neu U, Stehle T, Atwood WJ. 2009. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology* 384(2):389-399.
- Nguyen NL, Le BM, Wang D. 2009. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis* 15(8):1199-1205.
- Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH. 2000. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 342(18):1309-1315.
- Nickeleit V, Mihatsch MJ. 2006. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Transpl Int* 19(12):960-973.
- Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. 2003. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12(6):599-605.
- Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. 2006. Latent and productive polyomavirus infections of renal allografts: morphological, clinical, and pathophysiological aspects. *Adv Exp Med Biol* 577:190-200.
- Niesters HG. 2004. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 10(1):5-11.

- Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y. 2007. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol* 65(1):103-111.
- Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. 2007. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol* 40(4):307-311.
- Norkin LC, Ouellette J. 1976. Cell killing by simian virus 40: variation in the pattern of lysosomal enzyme release, cellular enzyme release, and cell death during productive infection of normal and simian virus 40-transformed simian cell lines. *J Virol* 18(1):48-57.
- Nukuzuma S, Takasaka T, Zheng HY, Zhong S, Chen Q, Kitamura T, Yogo Y. 2006. Subtype I BK polyomavirus strains grow more efficiently in human renal epithelial cells than subtype IV strains. *J Gen Virol* 87(Pt 7):1893-1901.
- Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, Bjorang O, Scott H, Midtvedt K, Rinaldo CH. 2006. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol* 78(3):384-393.
- Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. 2009. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol* 81(11):1959-1967.
- Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1(7712):1257-1260.
- Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Spinelli G, Lo Muzio L, Rubini C, Scapoli L. 2010. Absence of Simian virus 40, BK, and JC polyomavirus DNA in squamous cell carcinoma limited to the oral cavity. *Head Neck* 32(3):375-380.
- Perets TT, Silberstein I, Rubinov J, Sarid R, Mendelson E, Shulman LM. 2009. High frequency and diversity of rearrangements in polyomavirus bk noncoding regulatory regions cloned from urine and plasma of Israeli renal transplant patients and evidence for a new genetic subtype. *J Clin Microbiol* 47(5):1402-1411.
- Perez-Liz G, Del Valle L, Gentilella A, Croul S, Khalili K. 2008. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol* 64(4):379-387.
- Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchi A, Melis M, Orsi N. 1998a. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 56(4):372-376.
- Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchi A, Melis M, Orsi N. 1998b. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 56(4):372-376.
- Pietropaolo V, Fioriti D, Simeone P, Videtta M, Di Taranto C, Arancio A, Orsi N, Degener AM. 2003. Detection and sequence analysis of human polyomaviruses DNA from autoptic samples of HIV-1 positive and negative subjects. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16(3):269-276.
- Pingret JL, Boucraut-Baralon C, Guerin JL. 2008. Goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks. *Vet Rec* 162(5):164.
- Priftakis P, Bogdanovic G, Kalantari M, Dalianis T. 2001. Overrepresentation of point mutations in the Sp1 site of the non-coding control region of BK virus in bone marrow transplanted patients with haemorrhagic cystitis. *J Clin Virol* 21(1):1-7.
- Prosser SE, Orentas RJ, Jurgens L, Cohen EP, Hariharan S. 2008. Recovery of BK virus large T-antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of bk virus nephritis. *Transplantation* 85(2):185-192.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. 1999. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55(2):713-723.

- Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Bartlett ST. 2002. BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clin Transpl*:143-153.
- Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH. 2009. The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation* 87(5):621-630.
- Ramos E, Vincenti F, Lu WX, Shapiro R, Trofe J, Stratta RJ, Jonsson J, Randhawa PS, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Weir MR, Wali RK. 2004. Retransplantation in patients with graft loss caused by polyoma virus nephropathy. *Transplantation* 77(1):131-133.
- Randhawa P, Brennan DC. 2006. BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *Am J Transplant* 6(9):2000-2005.
- Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, Uhrmacher J, Weck K. 2004. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 42(3):1176-1180.
- Randhawa P, Uhrmacher J, Pasculle W, Vats A, Shapiro R, Eghtsead B, Weck K. 2005. A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients. *J Med Virol* 77(2):238-243.
- Randhawa P, Vats A, Shapiro R. 2006. The pathobiology of polyomavirus infection in man. *Adv Exp Med Biol* 577:148-159.
- Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, Vats A, Weck K, Swalsky P, Finkelstein S. 2003. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney international* 64(2):743-747.
- Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. 2002. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 73(7):1090-1094.
- Rangan SR, Lowrie RC, Roberts JA, Johnston PB, Warrick RP. 1974. Virus from stumptailed monkey (*Macaca arctoides*) kidney cultures. *Lab Anim Sci* 24(1):211-217.
- Razonable RR, Brown RA, Humar A, Covington E, Alecock E, Paya CV. 2005. A longitudinal molecular surveillance study of human polyomavirus viremia in heart, kidney, liver, and pancreas transplant patients. *J Infect Dis* 192(8):1349-1354.
- Rekvig OP, Bendiksen S, Moens U. 2006. Immunity and autoimmunity induced by polyomaviruses: clinical, experimental and theoretical aspects. *Adv Exp Med Biol* 577:117-147.
- Ricciardiello L, Chang DK, Laghi L, Goel A, Chang CL, Boland CR. 2001. Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol* 75(4):1996-2001.
- Ricciardiello L, Laghi L, Ramamirtham P, Chang CL, Chang DK, Randolph AE, Boland CR. 2000. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 119(5):1228-1235.
- Riley MI, Yoo W, Mda NY, Folk WR. 1997. Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J Virol* 71(8):6068-6074.
- Rinaldo CH, Hirsch HH. 2007. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5(1):105-115.
- Romagnoli L, Sariyer IK, Tung J, Feliciano M, Sawaya BE, Del Valle L, Ferrante P, Khalili K, Safak M, White MK. 2008. Early growth response-1 protein is induced by JC virus infection and binds and regulates the JC virus promoter. *Virology* 375(2):331-341.
- Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, Rubino MJ, Walker DL. 1983. Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection. *N Engl J Med* 308(20):1192-1196.
- Rubinstein R, Harley EH. 1989. BK virus DNA cloned directly from human urine confirms an archetypal structure for the transcriptional control region. *Virus Genes* 2(2):157-165.

- Rubinstein R, Schoonakker BC, Harley EH. 1991. Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *J Virol* 65(3):1600-1604.
- Rubio L, Pinczewski J, Drachenberg CB, Vera-Sempere FJ, Zhao RY. 2010. A multiplex real-time PCR method for quantification of BK and JC polyomaviruses in renal transplant patients. *Diagn Mol Pathol* 19(2):105-111.
- Sabath BF, Major EO. 2002. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S180-186.
- Sablina AA, Hahn WC. 2008. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Rev* 27(2):137-146.
- Saitoh K, Sugae N, Koike N, Akiyama Y, Iwamura Y, Kimura H. 1993. Diagnosis of childhood BK virus cystitis by electron microscopy and PCR. *J Clin Pathol* 46(8):773-775.
- Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisher K. 1997. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20(2):163-165.
- Sapp M, Day PM. 2009. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* 384(2):400-409.
- Sariyer IK, Akan I, Palermo V, Gordon J, Khalili K, Safak M. 2006. Phosphorylation mutants of JC virus agnoprotein are unable to sustain the viral infection cycle. *J Virol* 80(8):3893-3903.
- Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, Almeida A, Boitier F, Carlotti A, Couturaud B, Dupin N. 2009. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218(1):48-56.
- Saundh BK, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. 2010. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol* 63(8):714-718.
- Sawai ET, Rasmussen G, Butel JS. 1994. Construction of SV40 deletion mutants and delimitation of the binding domain for heat shock protein to the amino terminus of large T-antigen. *Virus Res* 31(3):367-378.
- Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, Hengel H, Ehlers B. 2011. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol* 85(9):4586-4590.
- Schmiege FI, Simmons DT. 1988. Characterization of the in vitro interaction between SV40 T antigen and p53: mapping the p53 binding site. *Virology* 164(1):132-140.
- Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell host & microbe* 7(6):509-515.
- Schwab N, Ulzheimer JC, Fox RJ, Schneider-Hohendorf T, Kieseier BC, Monoranu CM, Staugaitis SM, Welch W, Jilek S, Du Pasquier RA, Bruck W, Toyka KV, Ransohoff RM, Wiendl H. 2012. Fatal PML associated with efalizumab therapy: insights into integrin alphaLbeta2 in JC virus control. *Neurology* 78(7):458-467; discussion 465.
- Schwarz A, Mengel M, Haller H, Niedermeyer J. 2005. Polyoma virus nephropathy in native kidneys after lung transplantation. *Am J Transplant* 5(10):2582-2585.
- Schweighardt B, Atwood WJ. 2001. Glial cells as targets of viral infection in the human central nervous system. *Prog Brain Res* 132:721-735.
- Seif I, Khoury G, Dhar R. 1979. The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18(4):963-977.
- Sener A, House AA, Jevnikar AM, Boudville N, McAlister VC, Muirhead N, Rehman F, Luke PP. 2006. Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation* 81(1):117-120.
- Seo GJ, Fink LH, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. 2008. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J Virol* 82(20):9823-9828.
- Shah KV, Daniel RW, Strickler HD, Goedert JJ. 1997. Investigation of human urine for genomic sequences of the primate polyomaviruses simian virus 40, BK virus, and JC virus. *J Infect Dis* 176(6):1618-1621.

- Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa P. 2006. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. *J Virol* 80(18):8869-8879.
- Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. 2007. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol* 79(8):1199-1207.
- Shin SK, Li MS, Fuerst F, Hotchkiss E, Meyer R, Kim IT, Goel A, Boland CR. 2006. Oncogenic T-antigen of JC virus is present frequently in human gastric cancers. *Cancer* 107(3):481-488.
- Shinohara T, Matsuda M, Cheng SH, Marshall J, Fujita M, Nagashima K. 1993. BK virus infection of the human urinary tract. *J Med Virol* 41(4):301-305.
- Shinohara T, Nagashima K, Major EO. 1997. Propagation of the human polyomavirus, JCV, in human neuroblastoma cell lines. *Virology* 228(2):269-277.
- Shishido-Hara Y. 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 120(3):403-417.
- Silverman L, Rubinstein LJ. 1965. Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol* 5(2):215-224.
- Simmons DT. 2000. SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Adv Virus Res* 55:75-134.
- Singh HK, Andreoni KA, Madden V, True K, Detwiler R, Weck K, Nickleit V. 2009. Presence of urinary Haufen accurately predicts polyomavirus nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 20(2):416-427.
- Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Longhi C, Orsi N. 1990. Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Archives of virology* 113(3-4):291-296.
- Skolasky RL, Dal Pan GJ, Olivi A, Lenz FA, Abrams RA, McArthur JC. 1999. HIV-associated primary CNS lymphoma and utility of brain biopsy. *J Neurol Sci* 163(1):32-38.
- Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. 2004. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 4(12):2109-2117.
- Smith TF, Espy MJ, Mandrekar J, Jones MF, Cockerill FR, Patel R. 2007. Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 45(8):1056-1061.
- Spach DH, Bauwens JE, Myerson D, Mustafa MM, Bowden RA. 1993. Cytomegalovirus-induced hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 16(1):142-144.
- Stehle T, Gambelin SJ, Yan Y, Harrison SC. 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4(2):165-182.
- Stehle T, Harrison SC. 1996. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4(2):183-194.
- Stehle T, Harrison SC. 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16(16):5139-5148.
- Stehle T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC. 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature* 369(6476):160-163.
- Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. 2003. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *The Journal of general virology* 84(Pt 6):1499-1504.
- Stoner GL, Alappan R, Jobes DV, Ryschkewitsch CF, Landry ML. 2002. BK virus regulatory region rearrangements in brain and cerebrospinal fluid from a leukemia patient with tubulointerstitial nephritis and meningoencephalitis. *Am J Kidney Dis* 39(5):1102-1112.
- Stoner GL, R. 2001. The human polyomaviruses: past, present and future. Khalili KaS, G.L., editor. New York, NY, USA: Wiley-Liss.
- Sugimoto C, Hara K, Taguchi F, Yogo Y. 1989. Growth efficiency of naturally occurring BK virus variants in vivo and in vitro. *J Virol* 63(7):3195-3199.
- Sumner C, Shinohara T, Durham L, Traub R, Major EO, Amemiya K. 1996. Expression of multiple classes of the nuclear factor-1 family in the developing human brain: differential expression of two classes of NF-1 genes. *J Neurovirol* 2(2):87-100.

- Sundsford A, Johansen T, Flaegstad T, Moens U, Villand P, Subramani S, Traavik T. 1990. At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J Virol* 64(8):3864-3871.
- Sundsford A, Osei A, Rosenqvist H, Van Ghelue M, Silsand Y, Haga HJ, Rekvig OP, Moens U. 1999. BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viruria, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis* 180(1):1-9.
- Sundsford A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. 1994. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol* 32(5):1390-1394.
- Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. 2009. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 5(2):e1000368.
- Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. 2010. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog* 6(3):e1000801.
- Sweet BH, Hilleman MR. 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105:420-427.
- Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funyu T, Fujioka T, Omori S, Akiyama H, Chen Q, Zheng HY, Ohta N, Kitamura T, Yogo Y. 2004. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol* 85(Pt 10):2821-2827.
- Tan CS, Dezube BJ, Bhargava P, Autissier P, Wuthrich C, Miller J, Koranik IJ. 2009. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. *J Infect Dis* 199(6):881-888.
- Tan CS, Ellis LC, Wuthrich C, Ngo L, Broge TA, Jr., Saint-Aubyn J, Miller JS, Koranik IJ. 2010. JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 84(18):9200-9209.
- Tan CS, Koranik IJ. 2010. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 9(4):425-437.
- Taoufik Y, Gasnault J, Karaterki A, Pierre Ferey M, Marchadier E, Goujard C, Lannuzel A, Delfraissy JF, Dussaix E. 1998. Prognostic value of JC virus load in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 178(6):1816-1820.
- Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, Chang Y, Buck CB, Moore PS. 2009. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer* 125(6):1250-1256.
- Touze A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combela N, Sizaret PY, Guyetant S, Maruani A, Baay M, Tognon M, Coursaget P. 2010. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol* 48(5):1767-1770.
- Tremolada S, Akan S, Otte J, Khalili K, Ferrante P, Chaudhury PR, Woodle ES, Trofe-Clark J, White MK, Gordon J. 2010a. Rare subtypes of BK virus are viable and frequently detected in renal transplant recipients with BK virus-associated nephropathy. *Virology* 404(2):312-318.
- Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R, Elia F, Gordon J, Ferrante P. 2010b Jan. Mutations in the external loops of BK virus VP1 and urine viral load in renal transplant recipients. *J Cell Physiol*;195-199.
- Tremolada S, Delbue S, Larocca S, Carloni C, Elia F, Khalili K, Gordon J, Ferrante P. 2010c. Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus Res* 149(2):190-196.

- Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, Shokouh-Amiri MH, Vera SR, Alloway RR, Lo A, Gaber AO, Egidi MF. 2003. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 5(1):21-28.
- Trofe J, Hirsch HH, Ramos E. 2006. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis* 8(2):76-85.
- Trowbridge PW, Frisque RJ. 1995. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *Journal of neurovirology* 1(2):195-206.
- Trusch F, Klein M, Finsterbusch T, Kuhn J, Hofmann J, Ehlers B. 2012. Seroprevalence of the human polyomavirus 9 (HPyV9) and cross-reactivity to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV). *The Journal of general virology*.
- Tsai B, Qian M. 2010. Cellular entry of polyomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 343:177-194.
- Tsai RT, Wang M, Ou WC, Lee YL, Li SY, Fung CY, Huang YL, Tzeng TY, Chen Y, Chang D. 1997. Incidence of JC viruria is higher than that of BK viruria in Taiwan. *J Med Virol* 52(3):253-257.
- Vago L, Cinque P, Sala E, Nebuloni M, Caldarelli R, Racca S, Ferrante P, Trabottoni G, Costanzi G. 1996. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12(2):139-146.
- Vallbracht A, Lohler J, Gossmann J, Gluck T, Petersen D, Gerth HJ, Gencic M, Dorries K. 1993. Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. *Am J Pathol* 143(1):29-39.
- van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6(7):e1001024.
- van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bouwes Bavinck JN, de Melker H, Feltkamp MC. 2011. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg Infect Dis* 17(8):1355-1363.
- Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. 2012. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev Med Virol*.
- Van Ghelue M, Moens U, Bendiksen S, Rekvig OP. 2003. Autoimmunity to nucleosomes related to viral infection: a focus on hapten-carrier complex formation. *J Autoimmun* 20(2):171-182.
- Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. 2005. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis* 192(4):658-664.
- Vats A, Randhawa PS, Shapiro R. 2006. Diagnosis and treatment of BK virus-associated transplant nephropathy. *Adv Exp Med Biol* 577:213-227.
- Vaz B, Cinque P, Pickhardt M, Weber T. 2000. Analysis of the transcriptional control region in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 6(5):398-409.
- Vendrey A, Bienvenu B, Gasnault J, Thiebault JB, Salmon D, Gray F. 2005. Fulminant inflammatory leukoencephalopathy associated with HAART-induced immune restoration in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol* 109(4):449-455.
- Vera-Sempere FJ, Rubio L, Felipe-Ponce V, Garcia A, Mayordomo F, Sanchez-Plumed J, Beneyto I, Ramos D, Zamora I, Simon J. 2006. PCR assays for the early detection of BKV infection in 125 Spanish kidney transplant patients. *Clin Transplant* 20(6):706-711.
- Vera-Sempere FJ, Rubio L, Moreno-Baylach MJ, Garcia A, Prieto M, Camanas A, Mayordomo F, Sanchez-Plumed J, Beneyto I, Ramos D, Zamora I, Simon J. 2005. Polymerase chain reaction detection of BK virus and monitoring of BK nephropathy in renal transplant recipients at the University Hospital La Fe. *Transplant Proc* 37(9):3770-3773.
- Verschoor EJ, Groenewoud MJ, Fagrouch Z, Kewalapat A, van Gessel S, Kik MJ, Heeney JL. 2008. Molecular characterization of the first polyomavirus from a New World primate: squirrel monkey polyomavirus. *J Gen Virol* 89(Pt 1):130-137.



- Vidal JE, Fink MC, Cedeno-Laurent F, Delbue S, Ferrante P, Dauar RF, Filho FB, Nogueira RS, Calore EE, Pannuti CS, Trujillo JR, de Oliveira AC. 2007. BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. *AIDS Res Ther* 4:13.
- Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. 2003. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med* 114(8):675-684.
- Vilchez RA, Kusne S. 2006. Molecular and clinical perspectives of polyomaviruses: emerging evidence of importance in non-kidney transplant populations. *Liver Transpl* 12(10):1457-1463.
- Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, Razonable RR, Smith TF. 2007. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation* 84(3):340-345.
- Voltz R, Jager G, Seelos K, Fuhry L, Hohlfeld R. 1996. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol* 53(1):101-103.
- Ward JM, Lock A, Collins MJ, Jr., Gonda MA, Reynolds CW. 1984. Papovaviral sialoadenitis in athymic nude rats. *Lab Anim* 18(1):84-89.
- Wattier RL, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. 2008. Role of human polyomaviruses in respiratory tract disease in young children. *Emerg Infect Dis* 14(11):1766-1768.
- Wegner M, Drolet DW, Rosenfeld MG. 1993. Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10):4743-4747.
- Weil R, Vinograd J. 1963. The Cyclic Helix and Cyclic Coil Forms of Polyoma Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:730-738.
- White FA, 3rd, Ishaq M, Stoner GL, Frisque RJ. 1992. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 66(10):5726-5734.
- White MK, Gordon J, Reiss K, Del Valle L, Croul S, Giordano A, Darbinyan A, Khalili K. 2005. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* 50(1):69-85.
- White MK, Khalili K. 2011. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis* 203(5):578-586.
- White MK, Safak M, Khalili K. 2009. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol* 83(21):10846-10856.
- Whiteman ML, Post MJ, Berger JR, Tate LG, Bell MD, Limonte LP. 1993. Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. *Radiology* 187(1):233-240.
- Wognum AW, Sol CJ, van der Noordaa J, van Steenis G, Osterhaus AD. 1984. Isolation and characterization of a papovavirus from cynomolgus macaque kidney cells. *Virology* 134(1):254-257.
- Wong AS, Chan KH, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL, Leung AY. 2007. Relationship of pretransplantation polyoma BK virus serologic findings and BK viral reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 44(6):830-837.
- Yang SI, Lickteig RL, Estes R, Rundell K, Walter G, Mumby MC. 1991. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol* 11(4):1988-1995.
- Yiannoutsos CT, Major EO, Curfman B, Jensen PN, Gravell M, Hou J, Clifford DB, Hall CD. 1999. Relation of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid to survival in acquired immunodeficiency syndrome patients with biopsy-proven progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 45(6):816-821.
- Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F. 1990. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 64(6):3139-3143.
- Yogo Y, Zhong S, Shibuya A, Kitamura T, Homma Y. 2008a. Transcriptional control region rearrangements associated with the evolution of JC polyomavirus. *Virology* 380(1):118-123.

- Yogo Y, Zhong S, Suzuki M, Shibuya A, Kitamura T. 2007. Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the family. *J Virol* 81(23):13254-13258.
- Yogo Y, Zhong S, Xu Y, Zhu M, Chao Y, Sugimoto C, Ikegaya H, Shibuya A, Kitamura T. 2008b. Conserved archetypal configuration of the transcriptional control region during the course of BK polyomavirus evolution. *J Gen Virol* 89(Pt 8):1849-1856.
- Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miszkiet K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue EW, Jager HR, Clifford DB. 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354(9):924-933.
- Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, Kanazawa I, Kishida S, Nagashima K, Kitamura T, Yogo Y. 2005a. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 333(3):996-1002.
- Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. 2007. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect* 9(2):204-213.
- Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, Kabuki T, Joh K, Oh-ishi T, Ikegaya H, Nagashima K, Hall WW, Kitamura T, Yogo Y. 2005b. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* 86(Pt 7):2035-2045.
- Zhong S, Yogo Y, Ogawa Y, Oshiro Y, Fujimoto K, Kunitake T, Zheng HY, Shibuya A, Kitamura T. 2007a. Even distribution of BK polyomavirus subtypes and subgroups in the Japanese Archipelago. *Arch Virol* 152(9):1613-1621.
- Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. 2007b. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 45(1):193-198.
- zur Hausen H. 2008. Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* 123(2):247-250.
- zur Hausen H, Gissmann L. 1979. Lymphotropic papovaviruses isolated from African green monkey and human cells. *Med Microbiol Immunol* 167(3):137-153.
- Zurhein G, Chou SM. 1965. Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. *Science* 148(3676):1477-1479.